

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. April 2001 (19.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/27248 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/10,
15/82, C12Q 1/48, C12N 15/54

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09839

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Oktober 2000 (07.10.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 49 000.7 11. Oktober 1999 (11.10.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHL, Jens
[DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE).
EHRHARDT, Thomas [DE/DE]; Maulbronner Hof
49, 67346 Speyer (DE). SONNEWALD, Uwe [DE/DE];
Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). BOLDT, Ralf
[DE/DE]; Stieg 19, 06484 Quedlinburg (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten
Fassung: 9. August 2001

(15) Informationen zur Berichtigung:
siehe PCT Gazette Nr. 32/2001 vom 9. August 2001, Sec-
tion II

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PRPP-AMIDOTRANSFERASE FROM NICOTIANA TABACUM

(54) Bezeichnung: PRPP-AMIDOTRANSFERASE AUS NICOTIANA TABACUM

(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences coding for a polypeptide sequence with PRPP-amidotransferase (EC 2.4.2.14) activity. The invention relates furthermore to the use of said nucleic acids for production of a test system.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen codierend für ein Polypeptid mit PRPP-Amidotransferase (EC 2.4.2.14) Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäuren zur Herstellung eines Testsystems.



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. April 2001 (19.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/27248 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/10, (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09839
- (22) Internationales Anmeldedatum:
7. Oktober 2000 (07.10.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 49 000.7 11. Oktober 1999 (11.10.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). EHRHARDT, Thomas [DE/DE]; Maulbronner Hof 49, 67346 Speyer (DE). SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). BOLDT, Ralf [DE/DE]; Stieg 19, 06484 Quedlinburg (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/27248 A1

(54) Title: PRPP-AMIDOTRANSFERASE FROM PLANTS

(54) Bezeichnung: PRPP-AMIDOTRANSFERASE AUS PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences coding for a polypeptide sequence with PRPP-amidotransferase (EC 2.4.2.14) activity. The invention relates furthermore to the use of said nucleic acids for production of a test system.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen codierend für ein Polypeptid mit PRPP-Amidotransferase (EC 2.4.2.14) Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäuren zur Herstellung eines Testsystems.



.

.

.

.

.

PRPP-Amidotransferase aus Pflanzen

Beschreibung

5

- Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung pflanzlicher PRPP-Amidotransferase (Phosphoribosyl-pyrophosphat-Amidotransferase, E.C. 2.4.2.14) als neues Ziel für herbizide Wirkstoffe. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin DNA-Sequenzen kodierend für ein Polypeptid mit PRPP-Amidotransferase Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure kodierend für ein Protein mit PRPP-Amidotransferase Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung sowie Inhibitoren pflanzlicher PRPP-Amidotransferase identifiziert unter Verwendung dieses Testsystems. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäure SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 kodierend für pflanzliche PRPP-Amidotransferase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase, sowie zur Herstellung von Pflanzen mit modifiziertem Gehalt an Purinnukleotiden. Darüber hinaus betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs, wobei die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung behandelt werden, die spezifisch an PRPP-Amidotransferase, codiert durch eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser DNA-Sequenz hybridisierenden DNA-Sequenz, bindet und deren Funktion inhibiert.
- 30 Pflanzen sind in der Lage, aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen ihre Zellkomponenten zu synthetisieren.

- Dieser Prozeß ist nur möglich, indem biochemische Reaktionen zum Aufbau organischer Substanzen genutzt werden. Nukleotide werden in Pflanzen de novo synthetisiert. Als Bestandteil der Nukleinsäuren kommt ihnen besondere Bedeutung zu. In kovalenter Bindung aktivieren Nukleotide Kohlenhydrate für die Biosynthese von Polysacchariden. Ferner aktivieren sie Kopfgruppen für die Biosynthese von Lipiden. Nukleotide sind in nahezu alle Stoffwechselwege eingebunden. Nucleosidtriphosphate, vor allem ATP, treiben die meisten energieaufwändigen Reaktionen der Zelle. Adeninnukleotide sind darüber hinaus auch als Komponente in essentiellen Faktoren wie Coenzym A, sowie Nicotinamid- und Flavin-Coenzymen zu finden, die an vielen zellulären Reaktionen beteiligt sind. Die gekoppelte Hydrolyse von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) definiert für diverse zelluläre Prozesse, wie Proteintranslation, Microtubuli-Assemblierung, vesikulären

2

Transport, Signaltransduktion und Zellteilung eine Reaktionsrichtung. Ferner stellen Nukleotide die Ausgangsmetabolite zur Biosynthese von Methylxanthinen wie Coffein und Theobromin in Pflanzenfamilien der Rubiaceae und Theaceae dar.

5

Gene, die für PRPP-Amidotransferase kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen isoliert.

CDNAs die für PRPP-Amidotransferase Enzyme codieren konnten aus
10 diversen bakteriellen, tierischen und pflanzlichen Organismen
isoliert und charakterisiert werden. Pflanzliche PRPP-Amido-
transferase cDNAs wurden über Komplementation von *E. coli* purF-
Mutanten sowie über DNA-Hybridisierungstechniken aus *Glycine max*,
Vigna aconitifolia sowie aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (Ito
15 et al., Plant Molecular Biology 26(1994), 529-533; Kim et al.,
The Plant Journal 7(1995), 77-86). Sequenzhomologien deuten
darauf hin, daß die codierten Enzyme, ebenso wie PRPP-Amido-
transferase aus *E. coli* 4Fe-4S-Cluster enthalten. Die im Vergleich
zu *E. coli* N-terminal verlängerten PRPP-Amidotransferase Amino-
20 säuresequenzen aus Pflanzen ähneln plastidären Signalsequenzen.

In Pflanzen finden sich mehrere PRPP-Amidotransferase Isoenzyme,
die differentiell exprimiert werden. Die RNA für AtATase1 aus
Arabidopsis thaliana akkumuliert beispielsweise präferentiell in
25 den Wurzeln, während die AtATase2-Transkripte stärker in jungen
Blättern und Blüten gefunden wird (Ito et al., Plant Molecular
Biology 26(1994), 529-533). In *Vigna aconitifolia* akkumuliert
eine PRPP-Amidotransferase RNA hauptsächlich in Wurzelknöllchen
und wird in Wurzelgeweben durch L-Glutamin induziert (Kim et al.,
30 The Plant Journal 7(1995), 77-86).

Da Pflanzen auf einen effektiven Nukleotidstoffwechsel angewiesen
sind, läßt sich annehmen, daß sich die beteiligten Enzyme als
Ziel für Herbizide eignen. So wurden bereits Wirkstoffe beschrie-
35 ben, welche die pflanzliche de novo Purinbiosynthese inhibieren.
Beispielhaft ist der Naturstoff Hydanthocidin zu nennen, welcher
nach Phosphorylierung in planta die Adenylosuccinat-Synthetase
(ASS), inhibiert (Siehl et al., Plant Physiol. 110(1996),
753-758).

40

Inhibitoren für Enzyme der Purin-Biosynthese sind darüber hinaus
für ihre pharmakologische Wirkung in Tieren und Mikroorganismen
bekannt: Folat-Analoga inhibieren unter anderem das Enzym GAR-
Transformylase und wirken antiproliferativ, antiinflammatorisch
45 und immunsuppressiv. Mycophenolsäure (MPA) wirkt als Hemmstoff
der IMP-Dehydrogenase im GMP-Syntheseweg antimikrobiell, antivi-

ral und immunsuppressiv (Kitchin et al., Journal of the American Academy of Dermatology 37(1997), 445-449).

- Bakterielle PRPP-Amidotransferase kann beispielsweise durch
- 5 Glutaminantagonisten, wie Azaserin, 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucin (DON) oder L-2-Amino-4-Oxo-5-Chlorpentansäure sowie durch Mercaptopurin und Thioguanosin gehemmt werden. Glutaminantagonisten sind nicht spezifisch für PRPP-Amidotransferase und wirken auch auf andere Enzyme der Purinbiosynthese, wie z.B.
- 10 die Formylglycinamidinribotid-Synthase. Ein Nachweis der Wirksamkeit von Glutaminantagonisten auf pflanzliche PRPP-Amidotransferase steht noch aus.

- Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es zu belegen, daß PRPP-
- 15 Amidotransferase in Pflanzen ein geeignetes herbizides Target ist, die Isolierung einer vollständigen pflanzlichen cDNA kodierend für das Enzym PRPP-Amidotransferase und deren funktionelle Expression in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen, sowie die Herstellung eines effizienten und einfachen PRPP-Amidotransferase
- 20 Testsystems für die Durchführung von Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien.

- Die Aufgabe wurde gelöst durch Isolierung von Genen, die für das pflanzliche Enzym PRPP-Amidotransferase kodieren, der Her-
- 25 stellung von Antisensekonstrukten der PRPP-Amidotransferase, sowie der funktionellen Expression der PRPP-Amidotransferase in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen.

- Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Isolierung von Vollängen-cDNAs codierend für funktionelle PRPP-Amidotransferase (E.C.2.4.2.14) aus Tabak (*Nicotiana tabacum*).
- 30

- Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase aus Tabak, siehe Beispiel 1.
- 35

- Weiterer Gegenstand der Erfindung sind DNA-Sequenzen, die von
- 40 SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 abgeleitet sind oder mit einer dieser Sequenzen hybridisieren und die für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer PRPP-Amidotransferase besitzt.

- 45 Tabakpflanzen der Linie *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN, die ein Antisensekonstrukt der PRPP-Amidotransferase tragen, wurden näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigen in unterschiedlichem

4

- Maße eine Wachstumsretardierung, sowie ein Ausbleichen der Blätter. Die transgenen Linien sowie die Nachkommen der 1. und 2. Generation wiesen ein verringertes Wachstum in Erde auf. In Pflanzen mit verringertem Wachstum konnte eine im Vergleich
- 5 zum Wildtyp reduzierte PRPP-Amidotransferase RNA-Menge in der Northern-Hybridisierung detektiert werden. Ferner konnte durch Messung der Enzymaktivität eine im Vergleich mit Wildtyppflanzen verringerte Menge der PRPP-Amidotransferase Aktivität in den transgenen Linien detektiert werden, siehe Beispiel 7. Es
- 10 läßt sich eine Korrelation zwischen Wachstumsretardierung und Reduktion der PRPP-Amidotransferase Aktivität feststellen. Dieser klare Zusammenhang weist PRPP-Amidotransferase erstmals eindeutig als geeignetes Zielprotein für herbizide Wirkstoffe aus.
- 15 Um effiziente Hemmstoffe der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der PRPP-Amidotransferase aus Tabak in einen
- 20 Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in E. coli überexprimiert, siehe Beispiel 2.

Alternativ kann jedoch die Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID NO. 3 beispielsweise in

25 anderen Bakterien, in Hefen, Pilzen, Algen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Säugetierzellen exprimiert werden, siehe Beispiel 4.

Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette

30 exprimierte PRPP-Amidotransferase Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die PRPP-Amidotransferase spezifischen Hemmstoffen.

Dazu kann die pflanzliche PRPP-Amidotransferase beispielsweise

35 in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der PRPP-Amidotransferase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen,

40 siehe Beispiel 3.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren

45 gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen,

5

um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur
5 Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung, die die PRPP-Amidotransferase Aktivität in Pflanzen hemmen, bestehend aus

- 10 a) der Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzengeweben, oder Pflanzenzellen, die eine zusätzliche DNA-Sequenz codierend für ein Enzym mit PRPP-Amidotransferase Aktivität enthalten und in der Lage sind eine enzymatisch aktive PRPP-Amidotransferase überzuexprimieren;
- 15 b) das Aufbringen einer Substanz auf transgene Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile sowie auf nicht-transformierte Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile;
- 20 c) das Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz; und
- 25 d) dem Vergleich des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz;
- 30 wobei die Unterdrückung des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile ohne jedoch das Wachstum oder die Überlebensfähigkeit der transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile stark zu unterdrücken, belegt,
- 35 daß die Substanz aus b) herbizide Aktivität zeigt und die PRPP-Amidotransferase Enzymaktivität in Pflanzen inhibiert.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren pflanzlicher PRPP-Amidotransferasen, mit
40 potentiell herbizider Wirkung indem man das Gen einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase kloniert, in einer geeigneten Expressionskassette - beispielsweise in Insektenzellen - zur Überexpression bringt, die Zellen öffnet und den Zellextrakt direkt bzw. nach Anreicherung oder Isolierung des Enzyms PRPP-Amido-
45 transferase in einem Testsystem zur Messung der Enzymaktivität in Gegenwart von niedermolekularen chemischen Verbindungen einsetzt.

6

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung, die mit dem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs, wobei die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung behandelt werden, die spezifisch an pflanzliche PRPP-Amidotransferase bindet und deren Funktion inhibiert.

10

Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung können als Defolianten, Desiccants, Krautabtötungsmittel und insbesondere als Unkrautvernichtungsmittel verwendet werden. Unter Unkraut im weitesten Sinne sind alle Pflanzen zu verstehen, die

- 15 an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind. Ob die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems gefundenen Wirkstoffe als totale oder selektive Herbizide wirken, hängt unter anderem von der angewandten Menge ab.

- 20 Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung können beispielsweise gegen folgende Unkräuter verwendet werden:

Dikotyle Unkräuter der Gattungen:

Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis,

- 25 Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia, Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus, Taraxacum.

30

Monokotyle Unkräuter der Gattungen:

Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleo-

- 35 charis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, Apera.

Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren Sequenz für eine PRPP-Amidotransferase aus Tabak oder deren

- 40 funktionelles Äquivalent kodieren. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der

- 45 kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz,

- einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das PRPP-Amidotransferase-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.
- 10 Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten PRPP-Amidotransferase-DNA Sequenz und einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und
- 15 Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
- 20 Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

- Gegenstand der Erfindung sind auch funktionell äquivalente DNA-
- 25 Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 von 40 bis 100 % aufweisen.
- 30 Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 von 60 bis 100 % aufweisen.
- 35 Besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder
- 40 SEQ-ID No. 3 von 80 bis 100 % aufweisen.

- Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten
- 45 Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese

erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere
5 auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich
isolierten für eine PRPP-Amidotransferase kodierende Sequenz,
welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigt. Mutationen um-
fassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen
oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotide. Somit werden
10 beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vor-
liegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation
dieser Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation
kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodieren-
den Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktions-
15 enzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren
Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment,
abgeschwächt oder verstärkt ist.

20 Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus
auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen,
filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel der Herstellung von
ausreichenden Mengen des Enzyms PRPP-Amidotransferase eingesetzt
25 werden.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein aus Tabak
gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz SEQ-ID NO: 2 oder
SEQ-ID No. 4 bzw. Derivate oder Teile dieses Proteins mit PRPP-
30 Amidotransferase Aktivität.

Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit PRPP-
Amidotransferase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie
zu der Tabak PRPP-Amidotransferase mit den SEQ-ID NO: 2 oder
35 SEQ-ID NO. 4 von 20 - 100 % Identität.

Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit PRPP-Amidotransferase
Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu den Tabak
PRPP-Amidotransferasen mit den Sequenzen SEQ-ID NO: 2 oder
40 SEQ-ID NO. 4 von 50 - 100 % Identität.

Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit PRPP-Amido-
transferase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu den
Tabak PRPP-Amidotransferasen mit den Sequenzen SEQ-ID NO: 2 oder
45 SEQ-ID NO. 4 von 80 - 100 % Identität.

Weitere Aufgabe der Erfindung war die Überexpression des PRPP-Amidotransferase Gens in Pflanzen zur Herstellung von Pflanzen, die tolerant gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase sind.

5

Durch Überexpression der für eine PRPP-Amidotransferase kodierenden Gensequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase erreicht. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen

10
zen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten PRPP-Amidotransferase Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden.

15
Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des PRPP-Amidotransferase Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hemmstoffen der PRPP-Amidotransferase an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.20
Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, die durch zusätzliche Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 tolerant gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase
25 geworden sind, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, sowie Leguminosen.
30

Eine Veränderung des Nukleotidgehaltes in Pflanzen kann in verschiedenen Fällen von Nutzen sein. Säuglingsnahrungsprodukten auf pflanzlicher Basis werden beispielsweise Nukleotide zugesetzt, um
35 eine der Muttermilch entsprechende Nährstoffzusammensetzung zu erreichen. Weiterhin wäre ein optimierter Nukleotidgehalt im Falle der enteralen Ernährung von Patienten sinnvoll. Ein reduzierter Purin-Nukleotidgehalt in ernährungsrelevanten Pflanzen ist für die diätetische Ernährung Gicht-kranker Patienten relevant. Nukleotide wirken ferner geschmacksbildend und geschmacksverstärkend, so daß sich ein veränderter Nukleotidgehalt auf geschmackliche Eigenschaften von Pflanzen auswirkt.
40

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Pflanzen, die nach
45 Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in der Pflanze einen modifizierten Gehalt an Purinnukleotiden aufweisen. Dabei wird vorzugsweise der Gehalt der Purinnukleotide IMP, AMP

10

und/oder GMP bzw. deren Di- bzw. Trinukleotide ADP, ATP oder GDP, GTP erhöht.

Eine Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Purinnukleotiden wird
5 beispielsweise durch Expression einer zusätzlichen DNA-Sequenz
SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in sense- oder antisense-Orientierung in der Pflanze hergestellt. Modifizierter Gehalt an Purinnukleotiden bedeutet, daß sowohl Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Purinnukleotiden bei sense-Orientierung als auch Pflanzen mit er-
10 niedrigtem Gehalt an Guanosinnukleotiden bei sense-Orientierung (Cosuppression) oder antisense-Orientierung hergestellt werden können.

Erhöhung des Gehaltes an Purinnukleotiden bedeutet beispielsweise
15 im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung für Purinnukleotide durch funktionelle Überexpression des PRPP-Amidotransferase Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung pflanzlicher PRPP-Amidotransferase zur Veränderung der Konzentrationen von Methylxanthinen in Pflanzen.

25 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant
30 Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Pflanzen-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden, siehe
Beispiel 5.

35 Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der
40 einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21(1980), 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des
45 eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

11

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen PRPP-Amidotransferase Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant.Mol. Biol. (1993) 22, 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., Plant J. (1992) 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP0335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor sind in der Literatur beschrieben und können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Purinen bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J., (1989) 8, 2445-245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors kann ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology (1995) 10, 1090-1094). Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor, den USP- oder LEB4-Promotor), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine PRPP-Amidotransferase kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

12

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beispielsweise beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des Gehaltes an Purinnukleotiden in der Pflanze durch Überexpression des PRPP-Amidotransferase Gens in Kultur-
5 pflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die PRPP-Amidotransferase Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung
10 einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

15

Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches PRPP-Amidotransferase Polypeptid oder ein funktionell äquivalen-
20 ter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf PRPP-Amidotransferase Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regula-
25 tive Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das PRPP-Amidotransferase Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die
30 Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb
35 der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrich-
40 tung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

45

13

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

10

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835) oder funktionelle Äquivalente.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine PRPP-Amidotransferase kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press, Kapitel 6/7, 71-119) beschrieben.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, der biolistische Ansatz mit der Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).

45

14

Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, 5 Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies sowie Leguminosen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakteriensuspension gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

10

Der Biosyntheseort von Purinen ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des PRPP-Amidotransferase Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Purin-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern 15 auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen PRPP-Amidotransferase Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch 20 eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pA-CYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können. 25

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des PRPP-Amidotransferase Gehaltes in der Pflanze.

35

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. 40

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiele

Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen zugrunde liegen:

5

Allgemeine Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von
10 Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

15

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode
20 von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(1977), 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

25 Analyse von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben:

Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. 163(1987), 21) isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarose-
30 gel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino beschrieben durchgeführt (Anal. Biochem. 152(1986), 304). Die als Sonde eingesetzten DNA-Fragmente wurden mit einem Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, Mannheim) radioaktiv markiert
35 und nach Standardmethoden hybridisiert (Siehe Hybond-Benutzerhinweise, Amersham). Hybridisierungssignale wurden durch Autoradiographie mithilfe von X-OMAT AR Filmen der Fa. Kodak sichtbar gemacht.

40 Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden mit aufbereitetem, pyrogenfreiem Wasser, im weiteren Text als H₂O bezeichnet, aus einer Milli-Q
45 Water System Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Eschborn) angesetzt. Restriktionsendonucleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden von den Firmen AGS (Heidelberg),

16

Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Roche (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weierstadt), Pharmacia (Freiburg) Qiagen (Hilden) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sie wurden, soweit nicht anders erwähnt, nach Herstellerangaben verwendet.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli, XL-1 Blue) wurden von Stratagene bezogen. E. coli AT 2465 wurde bei dem coli genetic stock centre (Yale University, New Haven) bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (Agrobacterium tumefaciens, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. beschrieben (Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777). Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33(1985), 103-119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12(1984), 8711-8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221-230) benutzt werden.

Beispiel 1

Isolierung von cDNAs codierend für eine funktionelle PRPP-Amido-transferase aus Tabak.

Zur Isolierung von für PRPP-Amidotransferase codierenden cDNAs aus Nicotiana tabacum wurde ein für PRPP-Amidotransferase codierender cDNA-Klon aus Arabidopsis (AtATase1; Ito et al., Plant Molecular Biology 26(1994), 529-533; GenBank Accession number D28868) als Matrize zur Erzeugung einer Hybridisierungs-sonde mittels PCR verwendet.

Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/ μ l Matrizen DNA, 0,5 μ M der Oligonukleotide 5'-cgc tct aga act agt gga tc-3' und 5'-tcg agg tcg acg gta tc-3', 200 μ M Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C, 1,5 mM MgCl₂) und 0,02 U/ μ l Taq Polymerase (Perkin Elmer).

40

45

17

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Anlagerungstemperatur:	50°C, 1 min
Denaturierungstemperatur:	94°C, 1 min
5 Elongationstemperatur:	72°C, 2 min
Anzahl der Zyklen:	30

- Das resultierende Fragment von 1,9 kb wurde für ein heterologes Screening einer cDNA Bank von *Nicotiana tabacum* var. SR-1
- 10 (Stratagene) verwendet. Es wurden $3,0 \times 10^5$ Lambda Phagen der cDNA-Bibliothek auf Agarplatten mit *E. coli* XL1-blue als Bakterienstamm ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren (Sambrook et al. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nitrocellulosefilter
- 15 (Gelman Sciences) überführt und auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungs-sonde diente das oben beschriebene PCR-Fragment, das mit Hilfe des "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von α - ^{32}P -dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurde.
- 20 Die Hybridisierung der Membranen erfolgte nach Prähybridisierung bei 60°C in 3 x SSPE, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v), 0,02 % Polyvinylpyrrolidon (w/v), 0,02 % Ficoll 400 (w/v) und 50 mg/ml Kalbsthymus DNA für ca. 12 Stunden. Anschließend wurden die Filter 60 Minuten in 2 x SSPE, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v)
- 25 bei 60°C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und mittels Standardtechniken vereinzelt (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) und in Plasmide überführt (Stratagene).
- 30 Nach Restriktions- und Sequenzanalyse konnten zwei unterscheidbare Klone Ntpur1.1 (Klon 7.2) enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und Ntpur1.2 (Klon 9.2) enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 identifiziert werden, welche Leseraster mit Homologie
- 35 zu AtATase1 aus *Arabidopsis thaliana* codieren. Die Aminosäuresequenzen von Ntpur1.1 (SEQ-ID No. 2 - Länge: 573 Aminosäuren) und Ntpur1.2 (SEQ-ID No. 4 - Länge: 573 Aminosäuren) sind zu 97 % identisch, siehe Tabelle 1. Die Homologie auf Aminosäureebene zu AtATase1 beträgt für Ntpur1.1 81 % und für Ntpur1.2 85 %. Die
- 40 durchgehenden Leseraster beginnen mit Nukleotidbase 49 (Ntpur1.1) bzw. 25 (Ntpur1.2) und werden in Polypeptide von 573 Aminosäuren Länge übersetzt.

18

Tabelle 1

Aminosäurevergleich Ntpur1.1 x Ntpur1.2:

5	1	MAATVSTASAAATNKSPLSQPLDKPFCSPSQKLLSLSPKTLPKPYRTLVT	50
	1	MAATVSTASAAATNKYPLSQPLDKPFCSLSQKLLSLSPKTHPKPYRTLIT	50
10	51	ASSKNPLNDVVSFKKSADNTLDSYFDDKPREECGVVGIIYGDSEASRLC	100
	51	ASSKNPLNDVISFKKSADNTLDSYFDDDKPREECGVVGIIYGDSEASRLC	100
15	101	YLALHALLHRGQEGAGIVAVNDDVLKSITGVGLVSDVFNESKLDQLPGDM	150
	101	YLALHALQHRGQEGAGIVAVNDDVLKSITGVGLVSDVFNESKLDQLPGDM	150
20	151	AIGHVWYSTAGSSMLKNVQPFVANYKFGSVGVAHNGNLVNYKLLRGELEE	200
	151	AIGHVRYSTAGSSMLKNVQPFVASYKFGSVGVAHNGNLVNYKLLRSELEE	200
25	201	NGSIFNTSSDTEVVLHLIAISKARPFLLRIVEACEKIEGAYSMVFVTEDK	250
	201	NGSIFNTSSDTEVVLHLIAISKARPFLLRIVEACEKIEGAYSMVFVTEDK	250
30	251	LVAVRDPHGFRPLVMGRRSNGAVVFASSETCALDLIEATYEREVNPGEVVV	300
	251	LVAVRDPHGFRPLVMGRRSNGAVVFASSETCALDLIEATYEREVNPGEVVV	300
35	301	VDKDGVHSIYLMHPHEHKSCIFEHIYFALPNSVVFGRSVYESRRAFGEIL	350
	301	VDKDGVQSICLMPHPERKSCIFEHIYFALPNSVVFGRSVYESRRAFGEIL	350
40	351	ATEAPVECDVGIAVPDSGIVAALGYAAKAGVPFQQGLIRSHYVGRTFIEP	400
	351	ATEAPVECDVVIAPDSGVVAALGYAAKAGVPFQQGLIRSHYVGRTFIEP	400
45	401	SQKIRDFGVKLKLSPVRAVLEGKRVVVVDDSIVRGTTSSKIVRLLKEAGA	450
	401	SQKIRDFGVKLKLSPVRAVLEGKRVVVVDDSIVRGTTSSKIVRLLKEAGA	450
50	451	KEVHMRIASPPIIASCYYGVDTTPSSDELISNRMSVEEIKEFIGSDSLAFL	500
	451	KEVHMRIASPPIIASCYYGVDTTPSSDELISNRMSVEEIKEFIGSDSLAFL	500
55	501	PMDSLNLKLLGNDKSKFCYACFSGNYPVEPTGKVKRIGDFMDDGLSGDMDS	550
	501	PMDSLNLKLLGNDKSKFCYACFSGNYPVEPTGKVKRIGDFMDDGLSGDMDS	550
60	551	IDGGWLPGSSRVQKTILNEVRTG	573
	551	IDGGWLPGSSRVQKTILNEVRTS	573

Die pflanzlichen Proteine (Ntpur1.1, Ntpur1.2, AtATase1) weisen gegenüber PRPP-Amidotransferase Sequenzen von Bakterien und Mensch einen verlängerten N-Terminus mit einem großen Anteil basischer Aminosäuren auf (Tabelle 2), was auf die Funktion eines Transitpeptides für den plastidären Import hinweist (von Heijne et al., Eur. J. Biochem. 180(1989), 535-545).

19

Tabelle 2

Sequenzgegenüberstellung PRPP-Amidotransferase Proteine aus
 Arabidopsis thaliana (AtATase1), Bacillus subtilis (BacSu_purF),
 Mensch (pur1_hum) und Nicotiana tabaccum (Ntpur1.1, Ntpur1.2)

5		1				50
	AtATase1	-----	-----	-----SLN	QTILLTPINL	SLSSPNPSLN
	BacSu_purF	-----	-----	-----	-----	-----
	Ntpur1	LAPHLLFLLS	SFFPPPMAAT	VSTASAAATN	KSPLSQPLDK	PFCSPSQKL.
	Ntpur1-2	-----LS	SFFPPPMAAT	VSTASAAATN	KYPLSQPLDK	PFCSLSQKL.
10	pur1_hum	-----	-----	-----	-----	-----
		51				100
	AtATase1	LHISLS.FLL	PSPLLLLHSS	MESPPTSPLL	HPKNNSHAP	FDYHNDEDE
	BacSu_purF	-----	-----	-----	-----	-----MLAEIK
	Ntpur1	..LSLSPKTL	PKPYRTLVT	SSKNPLNDVV	SFKKSADNTL	DSYFDDDED..
15	Ntpur1-2	..LSLSPKTH	PKPYRTLIT	SSKNPLNDVI	SFKKSADNTL	DSYFDDDDD..
	pur1_hum	-----	-----	-----	-----	-----MELEEL
		101				150
	AtATase1	KPREECGVVG	IYGDPE....	..ASRLFYLA	LHALQHRGQE	GAGIVTVSPE
	BacSu_purF	GLNEECGVFG	IWGHEE....	..APQITYYG	LHSLQHRGQE	GAGIVATDGE
	Ntpur1	KPREECGVVG	IYGDSE....	..ASRLCYLA	LHALLHRGQE	GAGIVAVN.D
20	Ntpur1-2	KPREECGVVG	IYGDSE....	..ASRLCYLA	LHALQHRGQE	GAGIVAVN.D
	pur1_hum	GIREECGVFG	CIASGEWPTQ	LDVPHVITLG	LVGLQHRGQE	SAGIVTSDGS
		151				200
	AtATase1	KV..LQTITG	VGLVSEVFNE	SKLDQL.PGE	FAIAHVRYST	AGASMLKNVQ
	BacSu_purF	K...LTAHKG	QGLITEVFQN	GELSKV.KGK	GAIGHVRYAT	AGGGGYENVQ
25	Ntpur1	DV..LKSITG	VGLVSDVFNE	SKLDQL.PGD	MAIGHVWYST	AGSSMLKNVQ
	Ntpur1-2	DV..LKSITG	VGLVSDVFNE	SKLDQL.PGD	MAIGHVRYST	AGSSMLKNVQ
	pur1_hum	SVPTFKSHKG	MGLVNHVFTE	DNLKKLYVSN	LGIGHTRYAT	TGKCELENCQ
		201				250
	AtATase1	PFV.AGYRFG	SIGVAHNGNL	VNYKTLRAML	EENGSIFFNTS	SDTEVVLHLI
	BacSu_purF	PLLFRRSQNG	SLALAHNGNL	VNATQLKQQL	ENQGSIFQTS	SDTEVLAHLI
30	Ntpur1	PFV.ANYKFG	SVGVAHNGNL	VNYKLLRGEL	EENGSIFFNTS	SDTEVVLHLI
	Ntpur1-2	PFV.ASYKFG	SVGVAHNGNL	VNYKLLRSEL	EENGSIFFNTS	SDTEVVLHLI
	pur1_hum	PFVVETLH.G	KIAVAHNGEL	VNAARLRKKL	LRHGIGLSTS	SDSEMITQLL
		251				300
	AtATase1	AISKAR....	..PFFMRIID	ACEKLQGAYS	MVFVTEDEKL	AVRDPYGFRR
35	BacSu_purF	KRSGHF....	..TLKDQIKN	SLSMLKGAYA	FLIMTETEMI	VALDPNGLRP
	Ntpur1	AISKAR....	..PFLLRIVE	ACEKIEGAYS	MVFVTEDEKL	AVRDPHGFRR
	Ntpur1-2	AISKAR....	..PFLLRIVE	ACEKIEGAYS	MVFVTEDEKL	AVRDPHGFRR
	pur1_hum	AYTPPQEQDD	TPDWVARIKN	LMKEAPTAYS	LLIMHRDVIY	AVRDPYGNRR
		301				350
	AtATase1	LVMGR.....R	SNGAVVFASE	TCALDLIEAT	YEREVYPGEV
40	BacSu_purF	LSIGM.....M	GD.AYVVASE	TCAFDVVGAT	YLREVEPGEM
	Ntpur1	LVMGR.....R	SNGAVVFASE	TCALDLIEAT	YEREVNPGEV
	Ntpur1-2	LVMGR.....R	SNGAVVFASE	TCALDLIEAT	YEREVNPGEV
	pur1_hum	LCIGRLIPVS	DINDKEKKTS	ETEGWVVSSE	SCSFLSIGAR	YYREVLPGEI
		351				400

20

	AtATase1	LVVDKDG VKS	QCLMPKFEPK	Q...CIF EHI	YFSLPNSIVF	GRSVYESR HV
	BacSu_purF	LIINDEGMKS	ERFSMNINRS	I...CSMEYI	YFSRPDSNID	GINVHSARKN
	Ntpur1	VVVDKDG VHS	IYLMPHPEHK	S...CIF EHI	YFALPNSVVF	GRSVYESR RA
	Ntpur1-2	VVVDKDG VQS	ICLMPHPERK	S...CIF EHI	YFALPNSVVF	GRSVYESR RA
5	pur1_hum	VEISRHN VQT	LDIISRSEGN	PVAF CIFEYV	YFARPD SMFE	DQM VYTVRYR
		401				450
	AtATase1	FGEILATESP	VECDVVI AVP	DSGVVAALGY	AAKSGVPFQQ	GLIRSHYVGR
	BacSu_purF	LGKMLAQESA	VEADVVTGVP	DSSISAAIGY	AEATGIPYEL	GLIKNRYVGR
	Ntpur1	FGEILATEAP	VECDVGIAVP	DSGIVAALGY	AAKAGVPFQQ	GLIRSHYVGR
	Ntpur1-2	FGEILATEAP	VECDVVI AVP	DSGVVAALGY	AAKAGVPFQQ	GLIRSHYVGR
10	pur1_hum	CGQQLAIEAP	VDADLVSTVP	ESATPAALAY	AGKCGLPYVE	VLCKNRYVGR
		451				500
	AtATase1	TFIEPSQKIR	DFGVK LKLSP	VRGVLEGKRV	VVVD DSIVRG	TTSSKIVRLL
	BacSu_purF	TFIQPSQALR	EQGVRMKLSA	VRGVVEGKRV	VMVD DSIVRG	TTSRRIVTML
	Ntpur1	TFIEPSQKIR	DFGVK LKLSP	VRALLEGKRV	VVVD DSIVRG	TTSSKIVRLL
	Ntpur1-2	TFIEPSQKIR	DFGVK LKLSP	VRAVLEGKRV	VVVD DSIVRG	TTSSKIVRLL
15	pur1_hum	TFIQPNMRLR	QLGVAKKFGV	LSDNF K GKRI	VLVD DSIVRG	NTISPIIKLL
		501				550
	AtATase1	REAGAKEVHM	RIASPPIVAS	CYYGVDTPSS	EELISNRLSV	EEINEFIGSD
	BacSu_purF	REAGATEVHV	KISSPPIAHP	CFYGIDTSTH	EELIASSHSV	GEIRQEIGAD
	Ntpur1	KEAGAKEVHM	RIASPPIIAS	CYYGVDTPSS	DELISNRMSV	EEIKEFIGSD
20	Ntpur1-2	KEAGAKEVHM	RIASPPIIAS	CYYGVDTPSS	DELISNRMSV	EEIKEFIGSD
	pur1_hum	KESGAKEVHI	RVASPPIKYP	CFMGINIPTK	EELIANKPEF	DHLAEYLGAN
		551				600
	AtATase1	SLAFLSFDTL	KKHL.....GK...DSK.SFCYA	
	BacSu_purF	TLSFLSVEGL	LKGI.....GRKYDDSNCGQCLA	
	Ntpur1	SLAFLPMDSL	NKLL.....GN...DSK.SFCYA	
25	Ntpur1-2	SLAFLPMDSL	NKLL.....GN...DSK.SFCYA	
	pur1_hum	SVVYLSVEGL	VSSVQEGIKF	KKQKEKKHDI	MIQENGNGLE	CFEKS GHCTA
		601				650
	AtATase1	CFTGDYPVKP	TEVKVKRGGG	DFIDDGLVGS	FENIEAGWVR	~~~~~
	BacSu_purF	CFTGKYPT EI	YQD TVLPHVK	EAVLTK----	~~~~~	~~~~~
30	Ntpur1	CFSGNYPVEP	TG.KVKR.IG	DFMDDGLSGD	MDSIDGGWLP	GSSRVQKTIL
	Ntpur1-2	CFSGNYPVEP	TG.KVKR.IG	DFMDDGLSGD	MDSIDGGWLP	GSSRVQKTIL
	pur1_hum	CLTGKYPVEL	EW-----	~~~~~	~~~~~	~~~~~
		651				
	AtATase1	~~~~~				
	BacSu_purF	~~~~~				
35	Ntpur1	NEVRTG				
	Ntpur1-2	NEVRTS				
	pur1_hum	~~~~~				

Beispiel 2

40 Expression von PRPP-Amidotransferase aus Tabak in E.coli

Mit dem Ziel, die Aktivität des durch Ntpur1.2 codierten PRPP-Amidotransferase Enzyms nachzuweisen, wurde Ntpur1.2 in E.coli exprimiert. Dazu wurde in einer PCR mit Pfu-Polymerase mit den

45 Oligonucleotiden Jle336: 5'-ttttgctagcgactcgtat ttttgacg-3' und Jle337: 5'-aaaaagatctcaggttctaacttcat -3' und Ntpur1.2-DNA als Matrize ein Fragment von 1523 bp amplifiziert. Das erzeugte DNA-

21

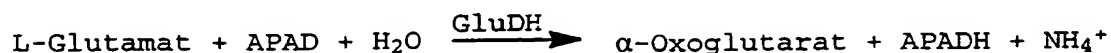
Fragment codiert für ein N-terminal um 86 Aminosäuren verkürztes PRPP-Amidotransferase Enzym, welches das anzunehmende Transitpeptid nicht mehr enthält. Diese verkürzte Form des PRPP-Amidotransferase Enzyms beginnt N-terminal mit den Aminosäuren MDSYFDDDD.

- 5 Mittels der Oligonucleotide wurden eine NheI-Schnittstelle sowie eine BglIII-Schnittstelle eingefügt, über die das erzeugte Fragment in den mit NheI und BamHI gespaltenen Expressionsvektor pET11a (Novagen) ligiert wurde.
- 10 Zur Expression wurde der E.coli Stamm BL21(DE3)LysS (Novagen) mit dem auf diese Weise erzeugten Konstrukt pETNtpur1.2 transformiert. Nach Übernachtskultur wurde eine Tageskultur auf $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und nach Erreichen einer $OD_{600} = 0,7$ mit 1mM IPTG induziert. Ein Gesamtzellextrakt wurde nach der Druckaufschlußmethode
- 15 ("French-Press") in 50mM Tris-HCl, pH 7,4; 150mM NaCl erzeugt. Ein überexprimiertes Protein von ca. 65 kDa wurde nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten. Das Protein wurde zur Erzeugung von Antiseren in Kaninchen injiziert (im Auftrag durchgeführt durch die Firma Eurogentec, Herstal,
- 20 Belgien).

Beispiel 3

- Testsystem zur Messung der Aktivität pflanzlicher PRPP-Amido-
- 25 transferase Aktivität

- Die vorbeschriebene Methode zur Messung pflanzlicher PRPP-Amidotransferase Aktivität nach Reynolds et al. (Archives of Biochemistry and Biophysics 229 (1984), 623-631) ist aufgrund der
- 30 Verwendung radioaktiver Substrate nicht für eine Testung im Hochdurchsatz geeignet. Es wurde daher auf Basis der bei Shid und Ishii (Journal of Biological Chemistry 66 (1969), 175-181) für PRPP-Amidotransferase aus E.coli beschriebenen Methode ein alternatives Testsystem entwickelt, mit dem die pflanzliche PRPP-Ami-
- 35 dotransferase Aktivität im Proteinextrakt anhand der Bildung des Reaktionsproduktes Glutamat nachgewiesen wird. Die Konzentration des entstehenden Glutamats wird dabei durch Umsetzung mit Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) und photometrische Verfolgung der APADH-Bildung bei 363 nm gemessen.



22

(PRPP = Phosphoribosylpyrophosphat, PRA = Phosphoribosylamin, APAD = 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid, PRAT = PRPP-Amido-transferase)

- 5 Dazu wurde der Reaktionsansatz (s.u.) für bis zu 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 5-minütige Inkubation bei 95°C gestoppt.

Reaktionsansatz:

10

375 µL	100 mM	Tris/HCl-Puffer pH 8.0
75 µL	100 mM	MgCl ₂
75 µL	30 mM	Phosphoribosyl-Pyrophosphat
75 µL	100 mM	L-Glutamin
15 50 µL		H ₂ O
<u>100 µL</u>		Proteinextrakt
750 µL		

- Der Nachweis des gebildeten Glutamats erfolgte im Nachweisansatz
 20 (s.u.) durch photometrische Messung der APADH-Zunahme bei 363 nm nach Zugabe der Glutamat-Dehydrogenase.

Nachweisansatz:

25 375 µL	100 mM	Tris/HCl-Puffer pH 8.0
75 µL	500 mM	KCl
125 µL		H ₂ O
75 µL	3 mM	APAD
<u>100 µL</u>		des Reaktionsansatzes
30 750 µL		

Start der Nachweisreaktion mit 2 µl (ca. 4 Units) Glutamat Dehydrogenase (Sigma).

- 35 Das Testsystem eignet sich in besonderer Weise zur Messung der PRPP-Amidotransferase Aktivität aus Pflanzenmaterial und in Expressionsextrakten zum Beispiel aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen.

40 Beispiel 4

Funktionale Expression von PRPP-Amidotransferase aus Tabak in Insektenzellen

- 45 Zur Expression von Ntpurl.1 in Baculovirus-infizierten Insektenzellen wurde das Bac-to-Bac Expressionssystem der Firma GibcoBRL eingesetzt. Dazu wurde Ntpurl.1 für eine PCR eingesetzt. Die Reak-

23

tionsgemische enthielten ca. 1 ng/ μ l Ntpur1.1 DNA, 0,5 μ M der Oligonukleotide 5'-tat agg atc cat gga ctc cta ttt tga cg-3' und 5'-atg aat tct agc tgg ttc taa ctt c-3', 200 μ M Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 0.04 U/ μ l Pfu Polymerase (Stratagene) und wurde auf 5 Pufferbedingungen nach Angaben des Herstellers eingestellt.

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Step 1:

10

Denaturierungstemperatur: 95°C, 0,5 min
Anlagerungstemperatur: 40°C, 0,5 min
Elongationstemperatur: 72°C, 2 min
Anzahl der Zyklen für Step 1: 2

15

Step 2:

Denaturierungstemperatur: 95°C, 0,5 min
Anlagerungstemperatur: 50°C, 0,5 min
20 Elongationstemperatur: 72°C, 3 min
Anzahl der Zyklen für Step 2: 25

Das PCR-Produkt wurde in den mit StuI geschnittenen Vector pFast-Bac1 (GibcoBRL) ligiert. Die korrekte Orientierung des Inserts
25 wurde durch Kontrollverdau mit KpnI sichergestellt. Der erhaltene Transfervector pFastBacNtpur1.2 wurde nach Herstellerangaben zur Erzeugung rekombinanter Baculoviren mittels Sf21 Insektenzellen (Invitrogen) verwendet. Mit dem rekombinanten Baculovirus (BvNtpur1.2) wurden Sf21 Insektenzellen infiziert. Die Zellen
30 wurden nach 2-4 Tagen durch Zentrifugation geerntet. Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnte im Gesamtextrakt ein Protein von ca. 54kDal entsprechend der erwarteten Größe der PRPP-Amidotransferase identifiziert werden. Ein Gesamtzellextrakt wurde nach der Druckaufschlußmethode ("French-Press") in Extraktionspuffer (100 mM HEPES pH 8,0; 2,5 mM EDTA; 10 % Glycerol; 20 mM DTE; 0,2 mM PEFA-Block) erzeugt und nach Entsalzung über eine PD10-Säule (Pharmacia) zur Messung der PRPP-Amidotransferase Aktivität im beschriebenen Assay (siehe Beispiel 3) verwendet.

40 Beispiel 5.

Erzeugung von Vektoren zur Pflanzentransformation

Zur Erzeugung binärer Vektoren für die Pflanzentransformation
45 wurde der Klon Ntpur1.1 mit SmaI und EcoRV gespalten und ein 1482 bp umfassendes Fragment isoliert, welches in den mit SmaI gespaltenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science

24

66(1990), 221-230) ligiert wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Antisense- bzw. Sense-Konstrukte wurden mit pBinAR-Ntpur1A bzw. pBinAR-Ntpur1 bezeichnet, siehe Abbildung 1.

5 Beispiel 6

Erzeugung transgener Tabakpflanzen

Die Plasmide pBinAR-Ntpur1A bzw. pBinAR-Ntpur1 wurden in Agrobac-
10 terium tumefaciens C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13(1984), 4777-4788). Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und
15 Skoog Physiol. Plant. 15(1962), 473) mit 2 % Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 2MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar.
20 Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphtylelessigsäure und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden
25 auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt.

Regenerierte Sprosse wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kul-
30 tivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer im 16 Stunden hell/8 Stunden dunkel-Rhythmus bei 60 % Luftfeuchte auf PRPP-Amidotransferase Expression und -Aktivität sowie auf veränderte Metabolitgehalte und phänotypische Wachstumsmerkmale untersucht. Veränderte Nukleotidgehalte können z.B. nach der Methode von
35 Stitt et al., FEBS Letters 145(1982), 217-222 bestimmt werden.

Beispiel 7

Analyse transgener Pflanzen

40 Transgene Pflanzen, die mit dem Konstrukt mit pBinAR-Ntpur1 transformiert wurden sind gekennzeichnet durch ein in unterschiedlichem Maße verringertes Wachstum sowie ein großflächiges Ausbleichen der Blätter im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen (Abb. 2). Die RNA-Analyse durch die Northernblot-
45 Technik wies in transgenen Linien mit dem beschriebenen Phänotyp eine verringerte Menge an Ntpur1.1-RNA auf (Abb. 3). Diese

25

Effekte waren auch in Folgegenerationen der transgenen Linien zu beobachten.

Um die Korellation zur Wachstumsreduktion zu testen, wurde die
5 PRPP-Amidotransferase Aktivität in den transgenen Linien gemessen
und mit jener in untransformierten Kontrollen verglichen. Dazu
wurden je ca. 30 g Blätter von ca. 20 cm hohen Pflanzen mit 50 ml
Extraktionspuffer bei +4°C homogenisiert.

10 Extraktionspuffer:

100 mM	HEPES pH 8,0
2,5 mM	EDTA
10 %	Glycerol
15 20 mM	DTE
0,2 mM	PEFA-Block (40mM)

Der Aufschlußextrakt wurde durch Miracloth (Calbiochem, Bad So-
den) filtriert und bei 16000 rpm in der Sorval Zentrifuge zentri-
20 fugiert. Der resultierende Überstand wurde mit Ammoniumsulfat bei
4°C gefällt. Die 30 % - 60 %-Stufe wurde im Extraktionspuffer
solubilisiert und über eine PD-10-Säule (Pharmacia, Schweden)
entsalzt. Der so gewonnene Extrakt ist mindestens 24 h stabil,
und kann bei -20°C nach Zusatz von Glycerol (50 % Endkonzen-
25 tration) für längere Zeit gelagert werden. Der Extrakt kann di-
rekt zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden. Die PRPP-Amido-
transferase Aktivität war in den transgenen Linien im Vergleich
zu Wildtyppflanzen deutlich verringert, siehe Abb. 4. Abb. 4A
zeigt die PRPP-Amidotransferase Aktivität bezogen auf die Pro-
30 teinmenge. Abb. 4B zeigt die PRPP-Amidotransferase Aktivität be-
zogen auf das Frischgewicht.

Diese Daten stellen einen direkten Zusammenhang zwischen verrin-
gerter PRPP-Amidotransferase Aktivität und verringertem Wachstum
35 der Tabakpflanzen her und weisen daher PRPP-Amidotransferase
erstmalig als geeignetes Zielprotein für herbizide Wirkstoffe aus.

Beispiel 8

40 Suche nach Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase Aktivität

Zur Suche nach Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase Aktivität
kann der in Beispiel 3 beschriebene in vitro Assay mit Hoch-
durchsatzmethoden verwendet werden. Die PRPP-Amidotransferase
45 Aktivität kann dazu aus Pflanzengewebe präpariert werden,
siehe Beispiel 7. Alternativ kann eine pflanzliche PRPP-Amido-
transferase in E.coli, Insektenzellen oder einem anderen

26

geeigneten Expressionssystem exprimiert werden. Auf diese Weise wurden bekannte PRPP-Amidotransferase Inhibitoren - wie Glutamin-antagonisten - identifiziert.

5 Beispiel 9

Analyse der der Adenin- und Guanin-Nukleotidgehalte in transgenen Pflanzen.

- 10 Von Wildtyppflanzen und transgenen Pflanzen, die mit dem Konstrukt pBinAR-Ntpurl transformiert wurden sowie deren Nachfolgegeneration (Linien 3.1, 3.2, 3.9., 25.1 und 38.8.) wurde Blattmaterial (je 5 Scheiben von 6 mm Durchmesser) geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden
- 15 TCA-Extrakte nach Standardmethoden hergestellt und für die Bestimmung der Nukleotidgehalte eingesetzt.

- AMP ist in den transgenen Linien mit Ausnahme der Linie 38.8 im grünen Blattbereich stark und in gelben Blattbereichen schwächer
- 20 im Vergleich zum Wildtyp (WT) reduziert (siehe Abb. 5).

Für die Guanosin-Nukleotide GTP, GDP und GMP konnte keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase, dadurch gekennzeichnet, daß diese DNA-Sequenz die Nukleotidabfolge SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 aufweist.
2. DNA-Sequenzen, die mit der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 gemäß Anspruch 1 oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, hybridisieren und für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer PRPP-Amidotransferase besitzt.
3. Protein mit PRPP-Amidotransferase Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ-ID No. 2 oder SEQ-ID No. 4 darstellt.
4. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die Teilsequenz 100 - 450 aus SEQ-ID No. 2 oder SEQ-ID No. 4 enthält.
5. Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die in SEQ-ID No. 2 oder SEQ-ID No. 4 dargestellte Sequenz enthält.
6. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Einführung in pro- oder eukaryontische Zellen, wobei diese Sequenz gegebenenfalls mit Steuerelementen, die die Transkription und Translation in den Zellen gewährleisten, verknüpft ist und zur Expression einer translatierbaren mRNA, die die Synthese einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase bewirkt, führt.
7. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung.

Zeichn.

28

8. Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die die Aktivität der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase inhibieren, dadurch gekennzeichnet, daß in einem ersten Schritt unter Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 PRPP-Amido-
5 transferase hergestellt wird und in einem zweiten Schritt die Aktivität der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase in Anwesenheit einer Testsubstanz gemessen wird.
9. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die
10 Messung der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase in einem High-Throughput-Screening (HTS) ausgeführt wird.
10. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung, die die PRPP-Amidotransferase Aktivität in Pflanzen
15 hemmen, bestehend aus
- a) der Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzengeweben, oder Pflanzenzellen, die eine zusätzliche DNA-Sequenz codierend für ein Enzym mit PRPP-Amidotransferase
20 Aktivität enthalten und in der Lage sind eine enzymatisch aktive PRPP-Amidotransferase überzuexprimieren;
- b) das Aufbringen einer Substanz auf transgene Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile sowie
25 auf nicht-transformierte Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile;
- c) das Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach
30 der Aufbringung der chemischen Substanz; und
- d) dem Vergleich des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach
35 der Aufbringung der chemischen Substanz;
- wobei die Unterdrückung des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile ohne jedoch das Wachstum oder die Überlebensfähigkeit der transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile stark
40 zu unterdrücken, belegt, daß die Substanz aus b) herbizide Aktivität zeigt und die PRPP-Amidotransferase Enzymaktivität
45 in Pflanzen inhibiert.

29

11. Testsystem basierend auf der Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 nach Anspruch 1 oder 2 zur Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen PRPP-Amido-transferase mit herbizider Wirkung.
- 5
12. Testsystem gemäß Anspruch 11 zur Identifizierung von Inhibitoren pflanzlicher PRPP-Amidotransferase, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym mit einem zu untersuchenden Testsubstrat inkubiert und nach einer geeigneten Reaktions-
10 zeit die enzymatische Aktivität des Enzyms im Vergleich zur Aktivität des nicht gehemmten Enzyms ermittelt wird.
13. Inhibitoren pflanzlicher PRPP-Amidotransferase.
- 15 14. Inhibitoren pflanzlicher PRPP-Amidotransferase, identifiziert unter Verwendung eines Testsystems nach Anspruch 11 oder 12.
15. Inhibitoren nach einem der Ansprüche 13 oder 14 zur Verwendung als Herbizid.
- 20
16. Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs, dadurch gekennzeichnet, daß die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung behandelt werden, die spezifisch an PRPP-Amidotransferase, codiert durch eine DNA-Sequenz nach
25 Anspruch 1 oder 2, bindet und deren Funktion inhibiert.
17. Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Purinnukleotiden hergestellt durch zusätzliche Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 nach Anspruch 1 oder 2 in
30 Sense- oder Antisense-Orientierung.

35

40

45

1/4

Fig. 1

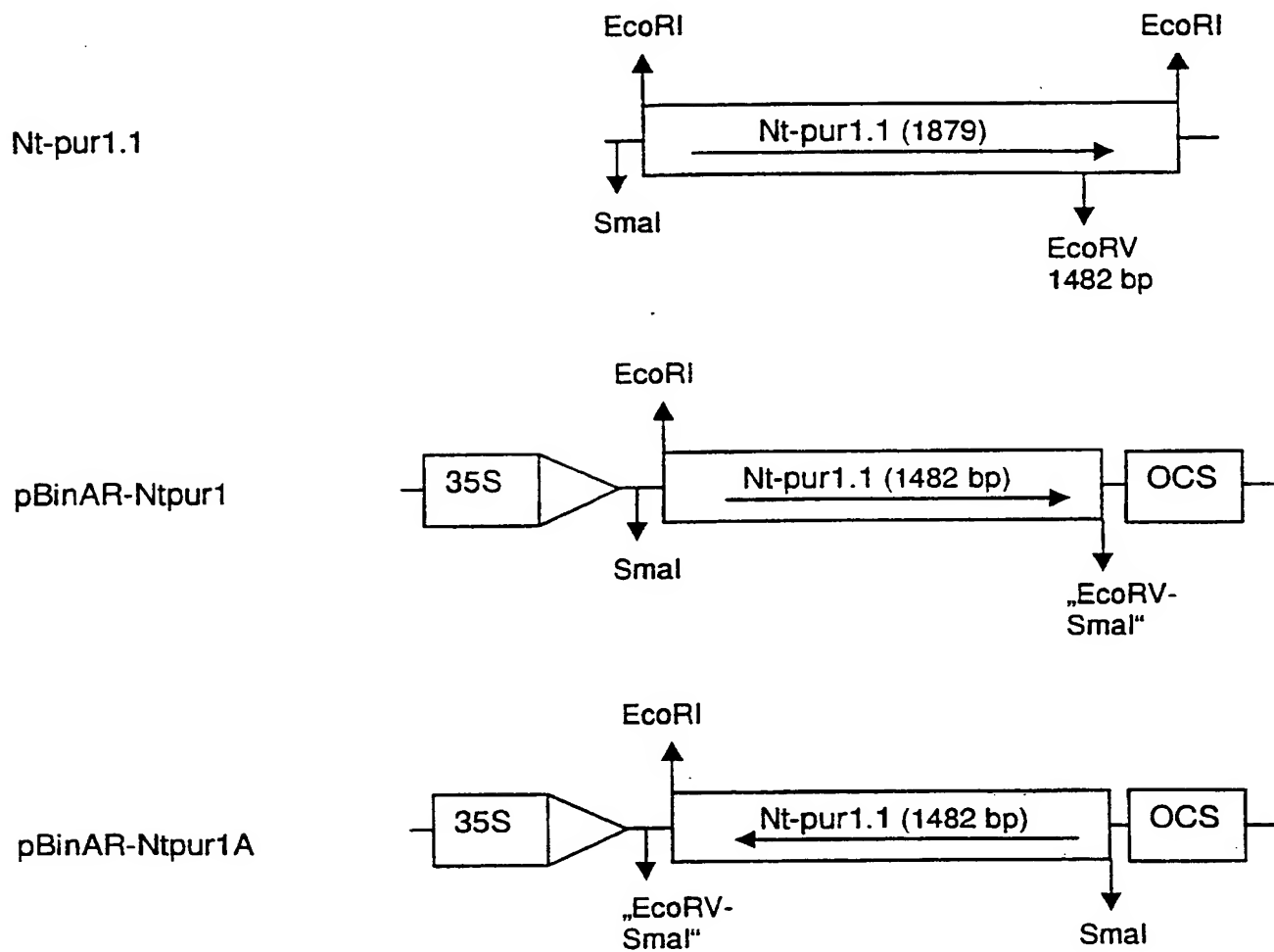


Fig. 2

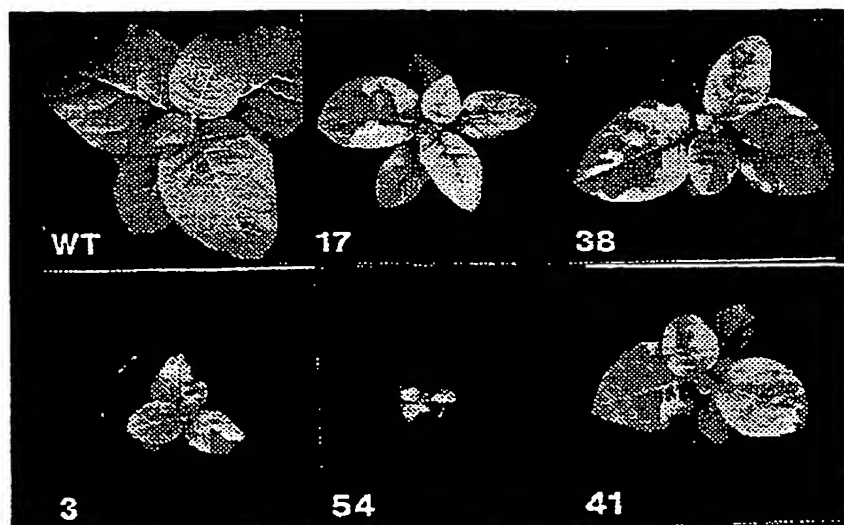


Fig. 3

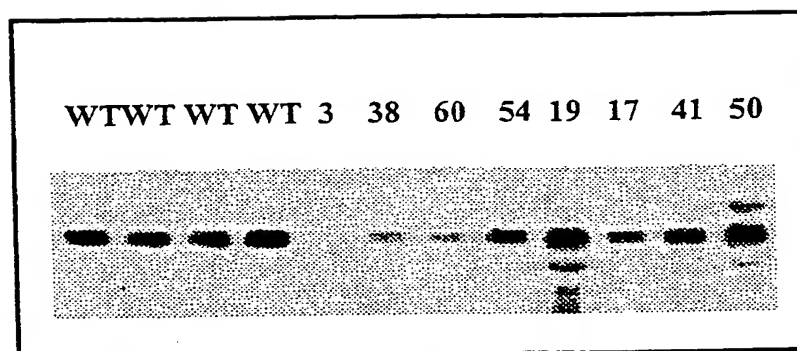


Fig. 4

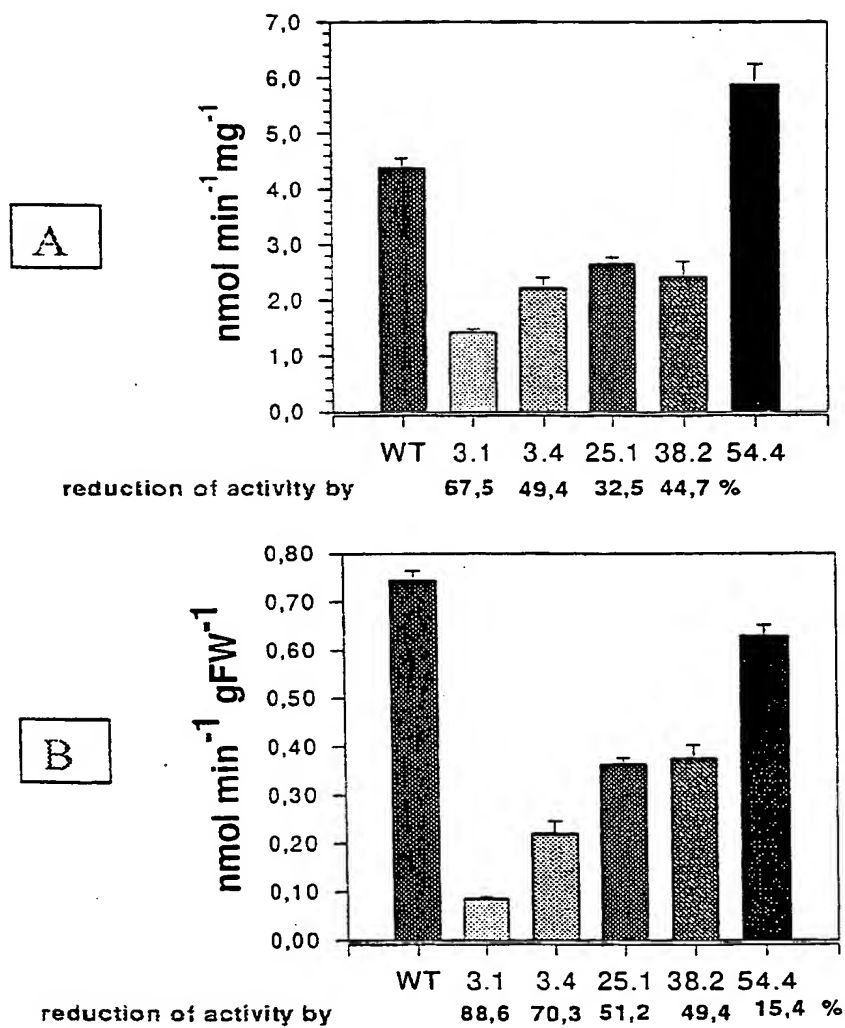
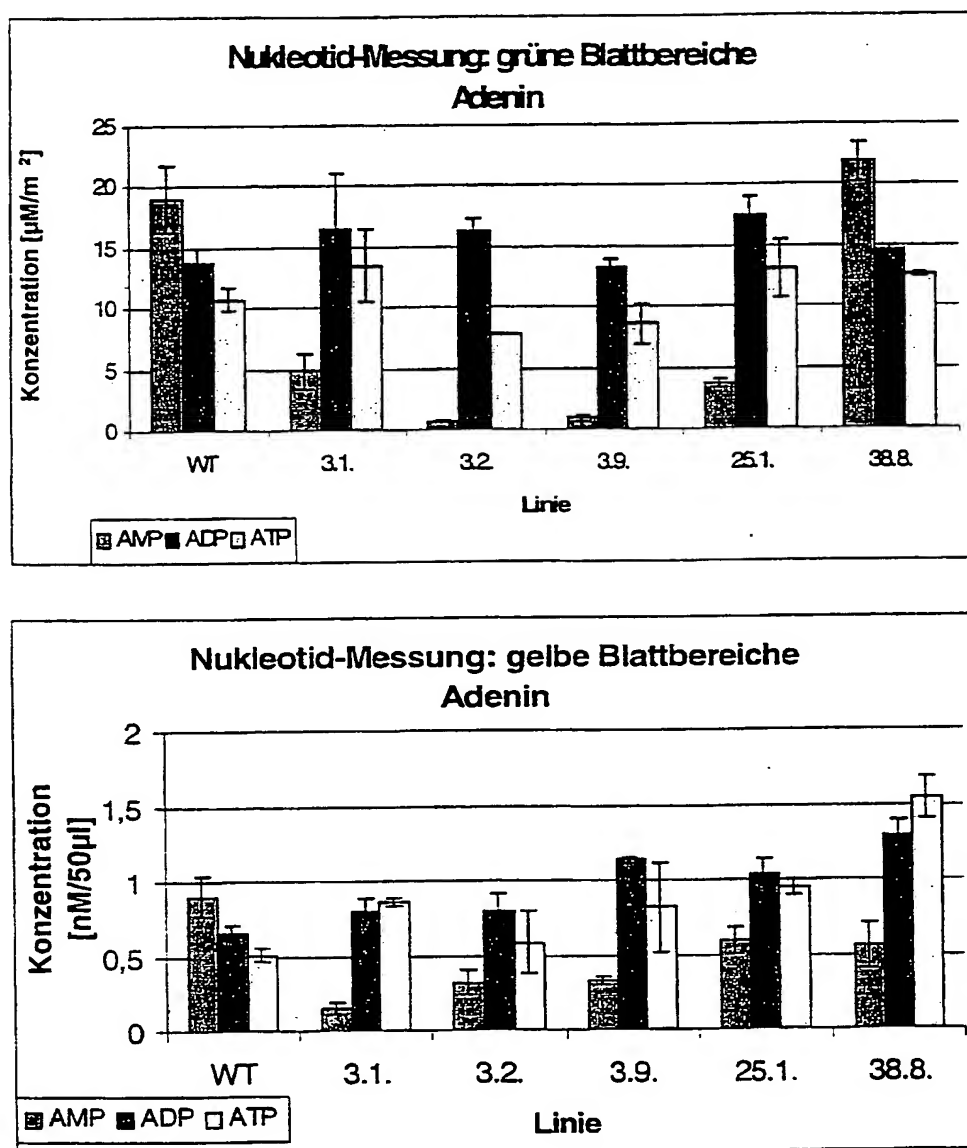


Fig. 5



SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> PRPP-Amidotransferase aus Pflanzen

<130> DE 19949000.7

<140> 50796

<141> 1999-10-11

<160> 4

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1879

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(1767)

<400> 1

ctagcccccc acttgctttt ccttctgtcc tccttttttc caccgccc atg gcc gcc 57
 Met Ala Ala
 1

acc gtc tcc acc gcc tct gcc gcc gcc acc aat aaa tct cct ctt tcg 105
 Thr Val Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala Thr Asn Lys Ser Pro Leu Ser
 5 10 15

cag ccc ctc gac aaa ccc ttt tgc tcc cca tct caa aag ctc tta tct 153
 Gln Pro Leu Asp Lys Pro Phe Cys Ser Pro Ser Gln Lys Leu Leu Ser
 20 25 30 35

tta tcc cct aaa acc ctc cca aaa ccc tat aga act ctc gtc acc gca 201
 Leu Ser Pro Lys Thr Leu Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu Val Thr Ala
 40 45 50

tct tcc aaa aac ccc tta aac gac gtc gtt tcg ttt aag aaa tca gct 249
 Ser Ser Lys Asn Pro Leu Asn Asp Val Val Ser Phe Lys Lys Ser Ala
 55 60 65

gac aat aca ttg gac tcg tat ttt gac gat gaa gac aaa ccc cgt gaa 297
 Asp Asn Thr Leu Asp Ser Tyr Phe Asp Asp Glu Asp Lys Pro Arg Glu
 70 75 80

gag tgt ggc gtt gtg ggc atc tat ggc gac tca gaa gct tca cgc ctt 345
 Glu Cys Gly Val Val Gly Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala Ser Arg Leu
 85 90 95

tgc tat tta gca ctt cac gcg ctt cta cac cgt ggc caa gaa ggc gcc 393
 Cys Tyr Leu Ala Leu His Ala Leu Leu His Arg Gly Gln Glu Gly Ala
 100 105 110 115

ggc att gtc gcc gtt aac gac gac gtt ctt aag tca att aca ggt gtt 441
 Gly Ile Val Ala Val Asn Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile Thr Gly Val
 120 125 130

ggg tta gta tcc gac gtg ttc aat gag tca aag ctt gac caa ctc cct 489
 Gly Leu Val Ser Asp Val Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp Gln Leu Pro
 135 140 145

ggt gac atg gca att ggc cac gtc tgg tac tct act gct ggc tct tct 537
 Gly Asp Met Ala Ile Gly His Val Trp Tyr Ser Thr Ala Gly Ser Ser
 150 155 160

atg tta aaa aat gtt cag cct ttt gtt gct aat tat aaa ttt ggg tca 585
 Met Leu Lys Asn Val Gln Pro Phe Val Ala Asn Tyr Lys Phe Gly Ser
 165 170 175

gtt ggt gtt gcc cat aat ggt aat tta gtg aat tat aag tta ctg cgt 633
 Val Gly Val Ala His Asn Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys Leu Leu Arg
 180 185 190 195

ggt gaa cta gaa gag aat ggg tca att ttt aat acg agt tct gat act 681
 Gly Glu Leu Glu Glu Asn Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser Ser Asp Thr
 200 205 210

gaa gtg gta ctt cac ctt att gct ata tcg aaa gct agg cct ttt tta 729
 Glu Val Val Leu His Leu Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg Pro Phe Leu
 215 220 225

ttg agg att gtt gag gct tgt gaa aaa att gaa ggt gct tat tct atg 777
 Leu Arg Ile Val Glu Ala Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala Tyr Ser Met
 230 235 240

gtg ttt gtt act gag gat aag ttg gtt gcc gta agg gat cct cat ggg 825
 Val Phe Val Thr Glu Asp Lys Leu Val Ala Val Arg Asp Pro His Gly
 245 250 255

ttt agg cca ttg gtt atg ggt agg aga agt aat ggt gct gtt gtt ttt 873
 Phe Arg Pro Leu Val Met Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala Val Val Phe
 260 265 270 275

gcg tcg gag acg tgt gct ttg gat ttg att gag gct act tat gag agg 921
 Ala Ser Glu Thr Cys Ala Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Arg
 280 285 290

gag gtg aat cct ggt gag gtt gtt gtt gtg gat aaa gat ggg gtt cat 969
 Glu Val Asn Pro Gly Glu Val Val Val Val Asp Lys Asp Gly Val His
 295 300 305

tct att tat ttg atg cct cat ccc gag cat aaa tct tgt atc ttt gag 1017
 Ser Ile Tyr Leu Met Pro His Pro Glu His Lys Ser Cys Ile Phe Glu
 310 315 320

cat att tac ttt gct ctg cct aat tcg gtc gtg ttt ggg agg tct gtg 1065
 His Ile Tyr Phe Ala Leu Pro Asn Ser Val Val Phe Gly Arg Ser Val
 325 330 335

tac gag tct agg cgt gct ttt gga gag att ctt gcg act gaa gct ccc 1113
 Tyr Glu Ser Arg Arg Ala Phe Gly Glu Ile Leu Ala Thr Glu Ala Pro
 340 345 350 355

gta gaa tgt gat gtt ggg ata gca gtt cct gat tcg ggt atc gtg gct 1161
 Val Glu Cys Asp Val Gly Ile Ala Val Pro Asp Ser Gly Ile Val Ala
 360 365 370

gcg ctc ggt tat gct gct aaa gcg ggg gta ccg ttt caa caa ggt ttg 1209
 Ala Leu Gly Tyr Ala Ala Lys Ala Gly Val Pro Phe Gln Gln Gly Leu
 375 380 385

ata agg tcg cat tat gtt ggt agg aca ttt atc gag ccg tcg cag aag 1257
 Ile Arg Ser His Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Glu Pro Ser Gln Lys
 390 395 400

ata agg gat ttc ggg gtg aag ctt aag ttg tca cca gtt agg gca tta 1305
 Ile Arg Asp Phe Gly Val Lys Leu Lys Leu Ser Pro Val Arg Ala Leu
 405 410 415

ttg gag ggg aaa agg gtt gtg gtc gtg gac gat tca atc gtt aga ggg 1353
 Leu Glu Gly Lys Arg Val Val Val Val Asp Asp Ser Ile Val Arg Gly
 420 425 430 435

acg acc tcg tcc aag att gtg agg ttg ttg aag gag gcg ggt gcg aaa 1401
 Thr Thr Ser Ser Lys Ile Val Arg Leu Leu Lys Glu Ala Gly Ala Lys
 440 445 450

gag gtt cat atg agg att gca agc cca cca att ata gct tct tgt tat 1449
 Glu Val His Met Arg Ile Ala Ser Pro Pro Ile Ile Ala Ser Cys Tyr
 455 460 465

tat gga gtg gat act cct agt tca gat gag ctg ata tca aat agg atg 1497
 Tyr Gly Val Asp Thr Pro Ser Ser Asp Glu Leu Ile Ser Asn Arg Met
 470 475 480
 agt gtg gag gag att aag gag ttc att gga tcg gat tcg ctt gct ttt 1545
 Ser Val Glu Glu Ile Lys Glu Phe Ile Gly Ser Asp Ser Leu Ala Phe
 485 490 495
 ctg cca atg gat agc ttg aat aag ttg tta ggc aat gat tct aaa agc 1593
 Leu Pro Met Asp Ser Leu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp Ser Lys Ser
 500 505 510 515
 ttt tgc tat gct tgc ttt tcg ggc aat tac ccg gtc gag ccg acg ggt 1641
 Phe Cys Tyr Ala Cys Phe Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu Pro Thr Gly
 520 525 530
 aag gtt aaa agg att ggg gat ttc atg gat gat gga tta agt gga gat 1689
 Lys Val Lys Arg Ile Gly Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu Ser Gly Asp
 535 540 545
 atg gat tcc att gat ggt ggt tgg cta cca gga agt agt agg gtt caa 1737
 Met Asp Ser Ile Asp Gly Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser Arg Val Gln
 550 555 560
 aag act atc ttg aat gaa gtt aga acc ggc taaactttct tttccatggt 1787
 Lys Thr Ile Leu Asn Glu Val Arg Thr Gly
 565 570
 tgcttttagtt tttgctttgg atttctaattg cttgactata gaaattataa gtttcaatga 1847
 agtctctttt tctaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1879

<210> 2

<211> 573

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 2

Met Ala Ala Thr Val Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala Thr Asn Lys Ser
 1 5 10 15
 Pro Leu Ser Gln Pro Leu Asp Lys Pro Phe Cys Ser Pro Ser Gln Lys
 20 25 30
 Leu Leu Ser Leu Ser Pro Lys Thr Leu Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu
 35 40 45

Val Thr Ala Ser Ser Lys Asn Pro Leu Asn Asp Val Val Ser Phe Lys
 50 55 60

Lys Ser Ala Asp Asn Thr Leu Asp Ser Tyr Phe Asp Asp Glu Asp Lys
 65 70 75 80

Pro Arg Glu Glu Cys Gly Val Val Gly Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala
 85 90 95

Ser Arg Leu Cys Tyr Leu Ala Leu His Ala Leu Leu His Arg Gly Gln
 100 105 110

Glu Gly Ala Gly Ile Val Ala Val Asn Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile
 115 120 125

Thr Gly Val Gly Leu Val Ser Asp Val Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp
 130 135 140

Gln Leu Pro Gly Asp Met Ala Ile Gly His Val Trp Tyr Ser Thr Ala
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Met Leu Lys Asn Val Gln Pro Phe Val Ala Asn Tyr Lys
 165 170 175

Phe Gly Ser Val Gly Val Ala His Asn Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys
 180 185 190

Leu Leu Arg Gly Glu Leu Glu Glu Asn Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser
 195 200 205

Ser Asp Thr Glu Val Val Leu His Leu Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg
 210 215 220

Pro Phe Leu Leu Arg Ile Val Glu Ala Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala
 225 230 235 240

Tyr Ser Met Val Phe Val Thr Glu Asp Lys Leu Val Ala Val Arg Asp
 245 250 255

Pro His Gly Phe Arg Pro Leu Val Met Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala
 260 265 270

Val Val Phe Ala Ser Glu Thr Cys Ala Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr
 275 280 285

Tyr Glu Arg Glu Val Asn Pro Gly Glu Val Val Val Val Asp Lys Asp
 290 295 300

Gly Val His Ser Ile Tyr Leu Met Pro His Pro Glu His Lys Ser Cys
 305 310 315 320
 Ile Phe Glu His Ile Tyr Phe Ala Leu Pro Asn Ser Val Val Phe Gly
 325 330 335
 Arg Ser Val Tyr Glu Ser Arg Arg Ala Phe Gly Glu Ile Leu Ala Thr
 340 345 350
 Glu Ala Pro Val Glu Cys Asp Val Gly Ile Ala Val Pro Asp Ser Gly
 355 360 365
 Ile Val Ala Ala Leu Gly Tyr Ala Ala Lys Ala Gly Val Pro Phe Gln
 370 375 380
 Gln Gly Leu Ile Arg Ser His Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Glu Pro
 385 390 395 400
 Ser Gln Lys Ile Arg Asp Phe Gly Val Lys Leu Lys Leu Ser Pro Val
 405 410 415
 Arg Ala Leu Leu Glu Gly Lys Arg Val Val Val Val Asp Asp Ser Ile
 420 425 430
 Val Arg Gly Thr Thr Ser Ser Lys Ile Val Arg Leu Leu Lys Glu Ala
 435 440 445
 Gly Ala Lys Glu Val His Met Arg Ile Ala Ser Pro Pro Ile Ile Ala
 450 455 460
 Ser Cys Tyr Tyr Gly Val Asp Thr Pro Ser Ser Asp Glu Leu Ile Ser
 465 470 475 480
 Asn Arg Met Ser Val Glu Glu Ile Lys Glu Phe Ile Gly Ser Asp Ser
 485 490 495
 Leu Ala Phe Leu Pro Met Asp Ser Leu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp
 500 505 510
 Ser Lys Ser Phe Cys Tyr Ala Cys Phe Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu
 515 520 525
 Pro Thr Gly Lys Val Lys Arg Ile Gly Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu
 530 535 540
 Ser Gly Asp Met Asp Ser Ile Asp Gly Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser
 545 550 555 560

Arg Val Gln Lys Thr Ile Leu Asn Glu Val Arg Thr Gly
 565 570

<210> 3
 <211> 1869
 <212> DNA
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> CDS
 <222> (25)..(1743)

<400> 3
 ctgtcctcat ttttcccacc accc atg gcc gcc acc gtc tcc acc gcc tct 51
 Met Ala Ala Thr Val Ser Thr Ala Ser
 1 5

gcc gcc gcc acc aac aaa tat cct ctt tca cag ccc ctt gac aaa ccc 99
 Ala Ala Ala Thr Asn Lys Tyr Pro Leu Ser Gln Pro Leu Asp Lys Pro
 10 15 20 25

ttt tgc tcc cta tct caa aag ctc tta tct tta tcc cct aaa acc cat 147
 Phe Cys Ser Leu Ser Gln Lys Leu Leu Ser Leu Ser Pro Lys Thr His
 30 35 40

cct aaa ccc tac aga act ctc atc acc gcc tct tcc aaa aac ccc tta 195
 Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu Ile Thr Ala Ser Ser Lys Asn Pro Leu
 45 50 55

aac gac gtc att tcg ttt aag aaa tca gct gac aat acc ttg gac tcc 243
 Asn Asp Val Ile Ser Phe Lys Lys Ser Ala Asp Asn Thr Leu Asp Ser
 60 65 70

tat ttt gac gat gac gat aaa ccc cgt gaa gag tgc ggc gtt gtg ggc 291
 Tyr Phe Asp Asp Asp Asp Lys Pro Arg Glu Glu Cys Gly Val Val Gly
 75 80 85

atc tat ggc gac tca gaa gct tca cgc ctt tgc tat tta gca ctt cac 339
 Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala Ser Arg Leu Cys Tyr Leu Ala Leu His
 90 95 100 105

gcg ctt caa cac cgt ggc caa gaa ggc gcc ggc att gtc gcc gtt aac 387
 Ala Leu Gln His Arg Gly Gln Glu Gly Ala Gly Ile Val Ala Val Asn
 110 115 120

gac gac gtt ctt aag tca att aca ggt gtt ggg tta gta tcc gac gtg 435



Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile Thr Gly Val Gly Leu Val Ser Asp Val	
125 130 135	
ttc aat gag tca aag ctt gac caa ctc cct ggt gac atg gca att ggc	483
Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp Gln Leu Pro Gly Asp Met Ala Ile Gly	
140 145 150	
cac gta agg tac tct act gct ggc tct tct atg tta aaa aat gtt cag	531
His Val Arg Tyr Ser Thr Ala Gly Ser Ser Met Leu Lys Asn Val Gln	
155 160 165	
cct ttt gtt gct agt tat aaa ttt ggg tca gtt ggt gtt gcc cat aat	579
Pro Phe Val Ala Ser Tyr Lys Phe Gly Ser Val Gly Val Ala His Asn	
170 175 180 185	
ggt aat tta gtg aat tat aag tta ctg cgt agt gaa cta gag gaa aat	627
Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys Leu Leu Arg Ser Glu Leu Glu Glu Asn	
190 195 200	
ggg tca att ttt aat aca agt tct gat act gag gtt gta ctt cac ctt	675
Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser Ser Asp Thr Glu Val Val Leu His Leu	
205 210 215	
att gct ata tct aaa gct agg cca ttt tta ttg agg att gtt gag gct	723
Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg Pro Phe Leu Leu Arg Ile Val Glu Ala	
220 225 230	
tgt gaa aaa att gaa ggt gct tat tct atg gtg ttt gtt act gag gat	771
Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala Tyr Ser Met Val Phe Val Thr Glu Asp	
235 240 245	
aag ttg gtt gcc gta agg gat cct cat ggg ttt agg cca ttg gtt atg	819
Lys Leu Val Ala Val Arg Asp Pro His Gly Phe Arg Pro Leu Val Met	
250 255 260 265	
ggt agg aga agt aat ggt gct gtt gtt ttc gcg tct gag acg tgt gct	867
Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala Val Val Phe Ala Ser Glu Thr Cys Ala	
270 275 280	
ttg gat ttg att gag gct act tat gag agg gag gtg aat cct ggt gag	915
Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Arg Glu Val Asn Pro Gly Glu	
285 290 295	
gtt gtt gtt gtg gat aaa gat ggg gtt cag tct att tgt ttg atg cct	963
Val Val Val Val Asp Lys Asp Gly Val Gln Ser Ile Cys Leu Met Pro	
300 305 310	
cat cct gag cgt aaa tct tgt atc ttt gag cat att tac ttt gct ctg	1011



His	Pro	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Ile	Phe	Glu	His	Ile	Tyr	Phe	Ala	Leu	
315						320					325					
cct	aat	tcg	gtc	gtg	ttt	ggg	agg	tct	gtg	tac	gag	tct	agg	cgt	gct	1059
Pro	Asn	Ser	Val	Val	Phe	Gly	Arg	Ser	Val	Tyr	Glu	Ser	Arg	Arg	Ala	
330					335					340				345		
ttc	ggg	gag	att	ctt	gct	act	gaa	gct	ccc	gtg	gaa	tgt	gat	gtt	gtg	1107
Phe	Gly	Glu	Ile	Leu	Ala	Thr	Glu	Ala	Pro	Val	Glu	Cys	Asp	Val	Val	
				350					355					360		
ata	gca	gtt	cct	gac	tcg	ggg	gtc	gtg	gct	gcg	ctc	ggg	tat	gct	gct	1155
Ile	Ala	Val	Pro	Asp	Ser	Gly	Val	Val	Ala	Ala	Leu	Gly	Tyr	Ala	Ala	
			365					370					375			
aaa	gca	ggg	gta	ccg	ttt	caa	caa	ggg	ttg	att	agg	tcg	cat	tat	gtt	1203
Lys	Ala	Gly	Val	Pro	Phe	Gln	Gln	Gly	Leu	Ile	Arg	Ser	His	Tyr	Val	
	380					385					390					
ggg	agg	acg	ttc	atc	gag	cca	tcg	cag	aag	ata	agg	gat	ttc	ggg	gtg	1251
Gly	Arg	Thr	Phe	Ile	Glu	Pro	Ser	Gln	Lys	Ile	Arg	Asp	Phe	Gly	Val	
	395					400				405						
aag	ctt	aag	ctg	tcg	ccg	gtt	agg	gcg	gtg	ttg	gag	gga	aaa	aga	gtt	1299
Lys	Leu	Lys	Leu	Ser	Pro	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Glu	Gly	Lys	Arg	Val	
410					415					420				425		
gtg	gtc	gtg	gat	gat	tcg	atc	gtt	aga	gga	acg	acc	tcg	tcc	aag	att	1347
Val	Val	Val	Asp	Ser	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Thr	Ser	Ser	Lys	Ile		
				430				435					440			
gtg	agg	ctg	tta	aag	gag	gcg	ggg	gcg	aaa	gag	gtt	cat	atg	agg	att	1395
Val	Arg	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Gly	Ala	Lys	Glu	Val	His	Met	Arg	Ile	
			445					450					455			
gca	agc	cca	cca	att	ata	gct	tct	tgt	tat	tat	gga	gtg	gat	act	cct	1443
Ala	Ser	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Ser	Cys	Tyr	Tyr	Gly	Val	Asp	Thr	Pro	
		460					465					470				
agt	tca	gat	gag	ttg	ata	tca	aat	agg	atg	agt	gtg	gag	gag	att	aag	1491
Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Ile	Ser	Asn	Arg	Met	Ser	Val	Glu	Glu	Ile	Lys	
		475				480				485						
gag	ttc	att	gga	tcg	gat	tcg	ctt	gct	ttt	ctg	cca	atg	gat	agc	ttg	1539
Glu	Phe	Ile	Gly	Ser	Asp	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Met	Asp	Ser	Leu	
490					495					500				505		
aat	aag	ctc	tta	ggc	aat	gat	tct	aaa	agc	ttt	tgc	tat	gct	tgc	ttt	1587

Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp Ser Lys Ser Phe Cys Tyr Ala Cys Phe
 510 515 520
 tcg ggc aat tac cca gtc gag ccg acg ggt aag gtt aaa agg ata ggg 1635
 Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu Pro Thr Gly Lys Val Lys Arg Ile Gly
 525 530 535
 gat ttc atg gat gat gga tta agt gga gat atg gat tcc att gat ggt 1683
 Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu Ser Gly Asp Met Asp Ser Ile Asp Gly
 540 545 550
 gga tgg cta cca gga agt agt agg gtt caa aag act atc ttg aat gaa 1731
 Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser Arg Val Gln Lys Thr Ile Leu Asn Glu
 555 560 565
 gtt aga acc agc taaactttct tttccatggt tgcttttagtt tttgctttgg 1783
 Val Arg Thr Ser
 570
 atttctaattg cttgaccata gaaattataa gtttcaatga agtctctttt tctatttgga 1843
 atgccacatg attctactga tctatg 1869

 <210> 4
 <211> 573
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

 <400> 4
 Met Ala Ala Thr Val Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala Thr Asn Lys Tyr
 1 5 10 15
 Pro Leu Ser Gln Pro Leu Asp Lys Pro Phe Cys Ser Leu Ser Gln Lys
 20 25 30
 Leu Leu Ser Leu Ser Pro Lys Thr His Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu
 35 40 45
 Ile Thr Ala Ser Ser Lys Asn Pro Leu Asn Asp Val Ile Ser Phe Lys
 50 55 60
 Lys Ser Ala Asp Asn Thr Leu Asp Ser Tyr Phe Asp Asp Asp Asp Lys
 65 70 75 80
 Pro Arg Glu Glu Cys Gly Val Val Gly Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala
 85 90 95

Ser Arg Leu Cys Tyr Leu Ala Leu His Ala Leu Gln His Arg Gly Gln
 100 105 110

Glu Gly Ala Gly Ile Val Ala Val Asn Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile
 115 120 125

Thr Gly Val Gly Leu Val Ser Asp Val Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp
 130 135 140

Gln Leu Pro Gly Asp Met Ala Ile Gly His Val Arg Tyr Ser Thr Ala
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Met Leu Lys Asn Val Gln Pro Phe Val Ala Ser Tyr Lys
 165 170 175

Phe Gly Ser Val Gly Val Ala His Asn Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys
 180 185 190

Leu Leu Arg Ser Glu Leu Glu Glu Asn Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser
 195 200 205

Ser Asp Thr Glu Val Val Leu His Leu Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg
 210 215 220

Pro Phe Leu Leu Arg Ile Val Glu Ala Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala
 225 230 235 240

Tyr Ser Met Val Phe Val Thr Glu Asp Lys Leu Val Ala Val Arg Asp
 245 250 255

Pro His Gly Phe Arg Pro Leu Val Met Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala
 260 265 270

Val Val Phe Ala Ser Glu Thr Cys Ala Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr
 275 280 285

Tyr Glu Arg Glu Val Asn Pro Gly Glu Val Val Val Val Asp Lys Asp
 290 295 300

Gly Val Gln Ser Ile Cys Leu Met Pro His Pro Glu Arg Lys Ser Cys
 305 310 315 320

Ile Phe Glu His Ile Tyr Phe Ala Leu Pro Asn Ser Val Val Phe Gly
 325 330 335

Arg Ser Val Tyr Glu Ser Arg Arg Ala Phe Gly Glu Ile Leu Ala Thr
 340 345 350

Glu Ala Pro Val Glu Cys Asp Val Val Ile Ala Val Pro Asp Ser Gly
 355 360 365

Val Val Ala Ala Leu Gly Tyr Ala Ala Lys Ala Gly Val Pro Phe Gln
 370 375 380

Gln Gly Leu Ile Arg Ser His Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Glu Pro
 385 390 395 400

Ser Gln Lys Ile Arg Asp Phe Gly Val Lys Leu Lys Leu Ser Pro Val
 405 410 415

Arg Ala Val Leu Glu Gly Lys Arg Val Val Val Val Asp Asp Ser Ile
 420 425 430

Val Arg Gly Thr Thr Ser Ser Lys Ile Val Arg Leu Leu Lys Glu Ala
 435 440 445

Gly Ala Lys Glu Val His Met Arg Ile Ala Ser Pro Pro Ile Ile Ala
 450 455 460

Ser Cys Tyr Tyr Gly Val Asp Thr Pro Ser Ser Asp Glu Leu Ile Ser
 465 470 475 480

Asn Arg Met Ser Val Glu Glu Ile Lys Glu Phe Ile Gly Ser Asp Ser
 485 490 495

Leu Ala Phe Leu Pro Met Asp Ser Leu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp
 500 505 510

Ser Lys Ser Phe Cys Tyr Ala Cys Phe Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu
 515 520 525

Pro Thr Gly Lys Val Lys Arg Ile Gly Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu
 530 535 540

Ser Gly Asp Met Asp Ser Ile Asp Gly Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser
 545 550 555 560

Arg Val Gln Lys Thr Ile Leu Asn Glu Val Arg Thr Ser
 565 570



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 00/09839

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/10 C12N15/82 C12Q1/48 C12N15/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 33925 A (YALE UNIVERSITY) 6 August 1998 (1998-08-06) page 5, line 9 -page 6, line 9 page 36, line 11 -page 39, line 13 ---	10
X	US 5 780 253 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14 July 1998 (1998-07-14) column 1, line 8 - line 64; claim 8; example 5 ---	10
A	ITO T. ET AL.: "Two amidophosphoribosyltransferase genes of Arabidopsis thaliana expressed in different organs" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 26, 1994, pages 529-533, XP000990353 cited in the application figure 3 ----- -/--	1-12,17



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 March 2001

Date of mailing of the international search report

02/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schönwasser, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09839

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BEVAN M. ET AL.: "Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone T4L20 (ESSA project)" EMBL DATABASE ENTRY ATT4L20; ACCESSION NO. AL023094, 29 April 1998 (1998-04-29), XP002163129</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-5

ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

Continuation of box I.2

Claims Nos. 13 – 16 not searched

Claims 13 – 16 relate to inhibitors of plant PRPP-amidotransferases and a method for using said inhibitors, without providing a technical characterisation thereof.

Additionally, such inhibitors are not defined in the description. Consequently, the purport of the claim is not clear and the object, for which protection is desired, is not fully disclosed and supported (Art. 5 and Art. 6 PCT).

For these purely speculative claims, whose purport is, in fact, merely a reiteration of the result to be achieved, no sensible search can, therefore, be carried out.

The applicant is reminded that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e)PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/09839

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9833925	A	06-08-1998	AU 6259198 A EP 1015602 A	25-08-1998 05-07-2000
US 5780253	A	14-07-1998	NONE	

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09839

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/10 C12N15/82 C12Q1/48 C12N15/54

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 33925 A (YALE UNIVERSITY) 6. August 1998 (1998-08-06) Seite 5, Zeile 9 -Seite 6, Zeile 9 Seite 36, Zeile 11 -Seite 39, Zeile 13 ---	10
X	US 5 780 253 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) Spalte 1, Zeile 8 - Zeile 64; Anspruch 8; Beispiel 5 ---	10
A	ITO T. ET AL.: "Two amidophosphoribosyltransferase genes of Arabidopsis thaliana expressed in different organs" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 26, 1994, Seiten 529-533, XP000990353 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 3 --- -/--	1-12,17



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/04/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schönwasser, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BEVAN M. ET AL.: "Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone T4L20 (ESSA project)"</p> <p>EMBL DATABASE ENTRY ATT4L20; ACCESSION NO. AL023094,</p> <p>29. April 1998 (1998-04-29), XP002163129</p> <p>-----</p>	1-5

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 13-16 nicht recherchiert

Ansprüche 13-16 beziehen sich auf Inhibitoren pflanzlicher PRPP-Amidotransferasen bzw. auf ein Verfahren zur Verwendung solcher Inhibitoren, ohne dass eine technische Charakterisierung dieser Inhibitoren angegeben wird.

Ausserdem werden derartige Inhibitoren nicht in der Beschreibung definiert. Folglich ist der Anspruchswortlaut unklar und der Gegenstand, für den Schutz angestrebt wird, nicht ausreichend offenbart und gestützt (Art. 5 und Art. 6 PCT).

Für diese rein spekulativen Ansprüche, deren Wortlaut in der Tat nur eine Wiedergabe des zu erzielenden Ergebnisses ist, kann daher keine sinnvolle Recherche durchgeführt werden.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Systema ales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09839

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9833925	A	06-08-1998	AU	6259198 A	25-08-1998
			EP	1015602 A	05-07-2000
<hr/>					
US 5780253	A	14-07-1998	KEINE		
<hr/>					

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T 12

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/050796	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/09839	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/10/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 11/10/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N9/10		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 30/04/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.02.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Hoff, C Tel. Nr. +49 89 2399 7895 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-30 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-7,9-11,13-17 ursprüngliche Fassung

8,12 eingegangen am 22/01/2002 mit Schreiben vom 21/01/2002

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-12, eingereicht mit dem Antrag.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den

Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
☒ Ansprüche Nr. 13-16.

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 13-16 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard

entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
 - ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
 - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
 - ☐ erfüllt ist
 - ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
 - ☐ alle Teile.
 - ☒ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. 1-12, 17 beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-12, 17
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-12, 17
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-12, 17
	Nein: Ansprüche	



2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: WO 98 33925 A (YALE UNIVERSITY) 6. August 1998 (1998-08-06)
- D2: US-A-5 780 253 (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14)
- D3: ITO T. ET AL.: 'Two amidophosphoribosyltransferase genes of Arabidopsis thaliana expressed in different organs' PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 26, 1994, Seiten 529-533, XP000990353 in der Anmeldung erwähnt

III. Ansprüche 13-16

Der Gegenstand der Ansprüche 13-16 wurde nicht recherchiert. Demzufolge wird auch keine Prüfung durchgeführt (Artikel 66.1(e) PCT).

IV-Einheitlichkeit

Der internationale Recherchenbericht bezieht sich auf den Gegenstand der Ansprüche 1-12 und 17. Die internationale Prüfungsbehörde ist jedoch der Meinung daß der Gegenstand der Anmeldung nicht einheitlich ist (Artikel 34(3), Regel 13 und 68 PCT).

Die Anmeldung besteht aus 2 Gruppen von Erfindungen:

Die erste Erfindung bezieht sich auf die Ansprüche 1-17 (alle teilweise). Die Erfindung bezieht sich auf die DNA-Sequenz von SEQ ID NO:1, die Protein Sequenz von SEQ ID N:2, die Verwendung dieser DNA- Sequenz, ein Verfahren und ein Testsystem zum Auffinden und Identifizieren von Substanzen die die Aktivität des Proteins inhibieren, Inhibitoren des Proteins, ein Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs durch die Hemmung der Aktivität des Proteins von SEQ ID NO:2 und eine Pflanze mit zusätzlicher Expression der DNA-Sequenz von SEQ ID NO:1.

Die zweite Erfindung bezieht sich auf die Ansprüche 1-17 (alle teilweise). Die Erfindung bezieht sich auf die DNA-Sequenz von SEQ ID NO:3, die Protein Sequenz von SEQ ID NO:4, die Verwendung dieser DNA-Sequenz, ein Verfahren und ein Testsystem zum Auffinden und Identifizieren von Substanzen die die Aktivität des Proteins inhibieren,

Inhibitoren des Proteins, ein Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs durch die Hemmung der Aktivität des Proteins von SEQ ID NO:4 und eine Pflanze mit zusätzlicher Expression der DNA-Sequenz von SEQ ID NO:3.

Die Erfindungen hängen nicht so zusammen, daß sie eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklichen (Regel 13.1 PCT). Diese allgemeine Idee sind DNA Sequenzen die für PRPP-Amidotransferase-Proteine kodieren.

Diese allgemeine Idee ist nicht erfinderisch weil aus dem Dokument D3 hervorgeht, dass PRPP-Amidotransferase Proteine sowohl in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen schon isoliert wurden.

Die erforderliche Einheitlichkeit der Erfindung (Regel 13.1 PCT) ist damit insofern nicht mehr gegeben, als zwischen den Gegenständen der Gruppen abhängiger Ansprüche kein technischer Zusammenhang im Sinne der Regel 13.2 PCT besteht, der in einem oder mehreren gleichen oder entsprechenden besonderen technischen Merkmalen zum Ausdruck kommt.

Die Prüfungsbehörde ist der Meinung, dass die vorliegenden Ansprüche in der Gesamtheit mit vertretbarem Aufwand geprüft werden können. Demzufolge wird der Anmelder nicht gebeten weitere Gebühren zu zahlen oder den Gegenstand der Anmeldung einzuschränken. Der Anmelder wird jedoch darauf hingewiesen, daß ein Einwand wegen mangelnder Einheitlichkeit während der regionalen Phase erhoben werden kann.

V.1 Neuheit

Die vorliegende Anmeldung erfüllt die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-12 und 17 neu ist.

V.2 Erfinderische Tätigkeit

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-12 und 17 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht.

V.2.1 Anspruch 1-5 und 17

Das Dokument D3 wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand der Ansprüche 1-2 angesehen. Es offenbart zwei Amidophosphoribosyltransferase Proteine/DNA Sequenzen von *Arabidopsis thaliana*. Der Gegenstand der vorliegenden Anmeldung unterscheidet sich von dem nächstliegender Stand der Technik durch die Klonierung einer Amidophosphoribosyltransferase von *Nicotiana tabacum*. Die mit der vorliegenden Anmeldung zu lösende Aufgabe kann somit in der Klonierung von Amidophosphoribosyltransferasen einer anderen Pflanzen Spezies gesehen werden. Die Lösung besteht in der Klonierung von Amidophosphoribosyltransferase von *Nicotiana tabacum* (Seq ID NO:1 und 2).

Die in Anspruch 1-2 der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung kann aus folgenden Gründen nicht als erfinderisch betrachtet werden (Artikel 33(3) PCT):

Aus dem Dokument D3 geht hervor, dass PRPP-Amidotransferase Proteine sowohl in Tieren, Mikroorganismen und Pflanzen schon isoliert wurden. Demzufolge ist es zu erwarten daß auch *Nicotiana tabacum* ein solches Protein enthält. Außerdem zeigt D3 auch, dass diese PRPP-Amidotransferase Proteine, aus unterschiedlichen Ursprungs, konservierte Bereiche enthalten (D3: Abbildung 3). Aus dem Dokument D2 geht hervor dass die Enzyme, die in dem Nukleotidstoffwechsel beteiligt sind, sich als Ziele für Herbizide eignen. Diese Informationen führen dazu, daß der Fachmann mittels Routinemethoden die DNA/Protein Sequenz von *Arabidopsis thaliana* verwenden würde um die DNA/Protein Sequenz von *Nicotiana tabacum* zu entschlüsseln . Demzufolge beruht auch der Gegenstand der Ansprüche 3-5 und 17 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit.

V.2.2 Anspruch 10

Der Gegenstand des Anspruchs 10 beruht nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit aus folgenden Gründen (Artikel 33(3) PCT):

D2 offenbart ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen die die Aktivität von spezifischen Enzymen in Pflanzen hemmen (Zusammenfassung, Anspruch 8 (a)). Das Verfahren aus D2 und das Verfahren aus der vorliegenden Anmeldung bestehen aus den gleichen Schritten. Der Fachmann ist also in der Lage dieses Verfahren anzuwenden, um Substanzen zu finden, die die PRPP-Amidotransferase hemmen.

V.2.3 Anspruch 7-9, 11 und 12

Der Gegenstand der Ansprüche 7-9, 11 und 12 beruht nicht auf einer erfinderische Tätigkeit aus folgende Gründe (Artikel 33(3) PCT):

D1 offenbart ein Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren von AdT Aktivität (Beispiel 5, Seite 46). Das Verfahren aus der vorliegenden Anmeldung resultiert aus dem Verfahren aus D1 und der Verwendung von Routinemethoden.

V.3 Gewerbliche Anwendbarkeit

Der Gegenstand der Ansprüche 1-12 und 17 ist gewerblich anwendbar (Artikel 33(4) EPÜ).

V.4 Anspruch 9

Anspruch 9 ist nicht abhängig von sich selbst sondern von Anspruch 8.

Neue Patentansprüche

8. Verfahren zum Auffinden von Substanzen mit herbizider Wirkung, die die Aktivität der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase inhibieren, dadurch gekennzeichnet, daß in einem ersten Schritt unter Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 PRPP-Amidotransferase hergestellt wird und in einem zweiten Schritt die Aktivität der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase in Anwesenheit einer Testsubstanz gemessen wird.

12. Testsystem gemäß Anspruch 11 zur Identifizierung von Inhibitoren pflanzlicher PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym mit einem zu untersuchenden Testsubstrat inkubiert und nach einer geeigneten Reaktionszeit die enzymatische Aktivität des Enzyms im Vergleich zur Aktivität des nicht gehemmten Enzyms ermittelt wird.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 00/09839

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/10 C12N15/82 C12Q1/48 C12N15/54

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 33925 A (YALE UNIVERSITY) 6. August 1998 (1998-08-06) Seite 5, Zeile 9 -Seite 6, Zeile 9 Seite 36, Zeile 11 -Seite 39, Zeile 13 ---	10
X	US 5 780 253 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) Spalte 1, Zeile 8 - Zeile 64; Anspruch 8; Beispiel 5 ---	10
A	ITO T. ET AL.: "Two amidophosphoribosyltransferase genes of Arabidopsis thaliana expressed in different organs" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 26, 1994, Seiten 529-533, XP000990353 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 3 --- -/-	1-12,17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/04/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schönwasser, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BEVAN M. ET AL.: "Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone T4L20 (ESSA project)" EMBL DATABASE ENTRY ATT4L20; ACCESSION NO. AL023094, 29. April 1998 (1998-04-29), XP002163129 -----	1-5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die en Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/JP 00/09839

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9833925	A	06-08-1998	AU	6259198 A	25-08-1998
			EP	1015602 A	05-07-2000
US 5780253	A	14-07-1998	KEINE		

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWES**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/050796	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%; vertical-align: top;">WEITERES VORGEHEN</td><td style="width: 50%; vertical-align: top;">siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5</td></tr></table>	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5		
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/09839	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%; vertical-align: top;">Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/10/2000</td><td style="width: 50%; vertical-align: top;">(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 11/10/1999</td></tr></table>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/10/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 11/10/1999
Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/10/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 11/10/1999		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.			

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

PRPP-AMIDOTRANSFERASE AUS NICOTIANA TABACUM

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.



WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 13-16 nicht recherchiert

Ansprüche 13-16 beziehen sich auf Inhibitoren pflanzlicher PRPP-Amidotransferasen bzw. auf ein Verfahren zur Verwendung solcher Inhibitoren, ohne dass eine technische Charakterisierung dieser Inhibitoren angegeben wird.

Ausserdem werden derartige Inhibitoren nicht in der Beschreibung definiert. Folglich ist der Anspruchswortlaut unklar und der Gegenstand, für den Schutz angestrebt wird, nicht ausreichend offenbart und gestützt (Art. 5 und Art. 6 PCT).

Für diese rein spekulativen Ansprüche, deren Wortlaut in der Tat nur eine Wiedergabe des zu erzielenden Ergebnisses ist, kann daher keine sinnvolle Recherche durchgeführt werden.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 00/09839

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSSACHSTANDES

IPK 7 C12N9/10 C12N15/82 C12Q1/48 C12N15/54

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 33925 A (YALE UNIVERSITY) 6. August 1998 (1998-08-06) Seite 5, Zeile 9 -Seite 6, Zeile 9 Seite 36, Zeile 11 -Seite 39, Zeile 13 ---	10
X	US 5 780 253 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) Spalte 1, Zeile 8 - Zeile 64; Anspruch 8; Beispiel 5 ---	10
A	ITO T. ET AL.: "Two amidophosphoribosyltransferase genes of Arabidopsis thaliana expressed in different organs" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 26, 1994, Seiten 529-533, XP000990353 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 3 --- -/--	1-12,17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/04/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schönwasser, D



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BEVAN M. ET AL.: "Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone T4L20 (ESSA project)" EMBL DATABASE ENTRY ATT4L20; ACCESSION NO. AL023094, 29. April 1998 (1998-04-29), XP002163129</p> <p>-----</p>	1-5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/09839

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9833925 A	06-08-1998	AU 6259198 A EP 1015602 A	25-08-1998 05-07-2000
US 5780253 A	14-07-1998	NONE	



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 28 August 2001 (28.08.01)	Applicant's or agent's file reference 0050/050796
International application No. PCT/EP00/09839	Priority date (day/month/year) 11 October 1999 (11.10.99)
International filing date (day/month/year) 07 October 2000 (07.10.00)	
Applicant LERCHL, Jens et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

30 April 2001 (30.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Nestor Santesso Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

REPLACED BY
ART 34 AMDT

We claim:

1. A DNA sequence containing the encoding region of a plant PRPP
5 amidotransferase, wherein this DNA sequence has the
nucleotide sequence SEQ-ID No. 1 or SEQ-ID No. 3.
2. A DNA sequence hybridizing with the DNA sequence SEQ-ID No. 1
10 or SEQ-ID No. 3 as claimed in claim 1 or parts thereof or
derivatives, derived from this sequence by insertion,
deletion or substitution and encoding a protein which has the
biological activity of a PRPP amidotransferase.
3. A protein with PRPP amidotransferase activity comprising an
15 amino acid sequence which constitutes a subsequence of at
least 100 amino acids from SEQ-ID No. 2 or SEQ-ID No. 4.
4. A protein as claimed in claim 3, which comprises, as amino
20 acid sequence, the subsequence 100 - 450 from SEQ-ID No. 2 or
SEQ-ID No. 4.
5. A protein as claimed in claim 4, which comprises, as amino
25 acid sequence, the sequence shown in SEQ-ID No. 2 or SEQ-ID
No. 4.
6. The use of a DNA sequence as claimed in claim 1 or 2 for
30 introduction into pro- or eukaryotic cells, this sequence
optionally being linked to control elements which ensure
transcription and translation in the cells and leading to the
expression of a translatable mRNA which causes the synthesis
of a plant PRPP amidotransferase.
7. The use of a DNA sequence as claimed in claim 1 or 2 for
35 generating an assay system for identifying herbicidally
active plant PRPP amidotransferase inhibitors.
8. A method of finding substances which inhibit the activity of
40 the plant PRPP amidotransferase, which comprises preparing,
in a first step, PRPP amidotransferase using a DNA sequence
as claimed in claim 1 or 2 and measuring, in a second step,
the activity of the plant PRPP amidotransferase in the
presence of a test substance.
9. The method as claimed in claim 9, wherein the plant PRPP
45 amidotransferase is measured in a high-throughput screening
(HTS).

10. A method of identifying herbicidally active substances which inhibit the PRPP amidotransferase activity in plants, with the following steps:

- 5 a) the generation of transgenic plants, plant tissues or plant cells which comprise an additional DNA sequence encoding an enzyme with PRPP amidotransferase activity and which are capable of overexpressing an enzymatically active PRPP amidotransferase;
- 10 b) applying a substance to transgenic plants, plant cells, plant tissue or plant parts and to untransformed plants, plant cells, plant tissue or plant parts;
- 15 c) determining the growth or the viability of the transgenic and the untransformed plants, plant cells, plant tissue or plant parts after application of the chemical substance; and
- 20 d) comparing the growth or the viability of the transgenic and the untransformed plants, plant cells, plant tissue or plant parts after applying the chemical substance;

25 where a suppression of the growth or the viability of the untransformed plants, plant cells, plant tissue or plant parts, but an absence of potent suppression of the growth or viability of the transgenic plants, plant cells, plant tissue or plant parts, confirms that the substance of b) shows herbicidal activity and inhibits the PRPP amidotransferase

30 enzyme activity in plants.

11. An assay system based on the expression of a DNA sequence SEQ-ID No. 1 or SEQ-ID No.9 as claimed in claim 1 or 2 for identifying herbicidally active plant PRPP amidotransferase

35 inhibitors.

12. An assay system as claimed in claim 11 for identifying plant PRPP amidotransferase inhibitors, which comprises incubating the enzyme with a test substrate to be studied and, after a

40 suitable reaction time, determining the enzymatic activity of the enzyme in comparison with the activity of the uninhibited enzyme.

13. A plant PRPP amidotransferase inhibitor.

45

14. A plant PRPP amidotransferase inhibitor identified using an assay system as claimed in claim 11 or 12.
- 5 15. An inhibitor as claimed in claim 13 or 14 for use as herbicide.
- 10 16. A method of eliminating undesired vegetation, which comprises treating the plants to be eliminated with a compound which binds specifically to PRPP amidotransferase encoded by a DNA sequence as claimed in claim 1 or 2 and which inhibits its function.
- 15 17. A plant with a modified purine nucleotide content, generated by additionally expressing a DNA sequence SEQ-ID No. 1 or SEQ-ID No. 3 as claimed in claim 1 or 2 in sense or antisense orientation.

20

25

30

35

40

45

